

**Die Fibers von *Ignicoccus hospitalis*:
Ultrastruktur, Verankerung und
molekularbiologische Untersuchungen**



DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
- BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN -
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Carolin Meyer
aus Eitensheim

im Jahr 2010

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 15. September 2010

Diese Arbeit wurde angeleitet von: PD Dr. Reinhard Rachel

Unterschrift: _____

***Meiner Familie,
in Liebe und Dankbarkeit***

*In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten
vor unseren Augen erstreckt.*

Isaac Newton (1643-1727)

Inhaltsverzeichnis

I	EINLEITUNG	1
II	MATERIAL UND METHODEN	11
1	Substanzen und Bezugsquellen	11
1.1	Chemikalien	11
1.2	Molekularmassenstandards	12
1.3	Enzyme/kommerzielle Puffer	12
1.4	PCR-Primer	13
1.5	Vektoren	13
1.6	Antikörper	14
1.7	Organismen	14
2	Kulturmedien	15
2.1	½ SME-Medium (Stetter <i>et al.</i> , 1983; modifiziert Huber <i>et al.</i> , 2003)	15
2.1.1	Zusammensetzung des ½ SME-Kulturmediums	15
2.1.2	Herstellung der Kulturmedien zur Kultivierung in Serumflaschen	15
2.1.3	Medienzusätze	16
2.2	Luria-Bertani-Medium (LB-Medium; Miller, 1972)	16
2.2.1	Zusammensetzung des LB-Mediums	16
2.2.2	Herstellung als Flüssigmedium und Gussplatten	17
3	Sterilisation	17
4	Kultivierung der Organismen	17
4.1	Kultivierung in Serumflaschen	17
4.2	Kultivierung in Cellulosekapillaren	18
4.3	Anzucht auf kohlebeschichteten Goldgrids	18
5	Isolation und Aufreinigung von Zellanhängen	19
5.1	Isolation von Zellanhängen aus dem Fermentationsüberstand	20
5.2	Dichtegradienten-Zentrifugation	20
5.3	Isolation und Dialyse der Fraktionen	20
6	Proteinbiochemische Methoden	21
6.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	21
6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
6.2.1	Herstellung der Gele	22
6.2.2	Probenvorbereitung	22
6.2.3	Elektrophoresebedingungen	23

6.2.4	Färbung von SDS-Gelen	23
6.2.5	Dokumentation	25
6.3	Western Blot	25
6.3.1	Transfer der Proteine auf PVDF-Membran	25
6.3.2	Detektion der Proteine über Coomassie-Färbung	26
6.3.3	Detektion der Proteine über immunologischen Nachweis	26
6.4	Co-Immunpräzipitation	27
6.4.1	Zellaufschluss	27
6.4.2	Vorbereitung der Sepharose Beads	28
6.4.3	Durchführung der Co-Immunpräzipitation	29
6.4.4	Modifizierte Silberfärbung im Vorfeld einer ESI Nano-LC MS/MS	30
6.5	Proteinsequenzierung	30
6.5.1	N-terminale Sequenzierung	30
6.5.2	In-Gel-Verdau und MALDI-TOF MS/MS	30
6.5.3	Proteinsequenzierung mit ESI Nano-LC MS/MS	31
6.6	Bioinformatische Auswertung von Proteinsequenzen	32
7	Molekulargenetische Methoden	33
7.1	DNA-Isolation	33
7.2	Bestimmung der DNA-Konzentration	34
7.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
7.4	Agarose-Gelelektrophorese	35
7.5	Aufreinigung von PCR-Produkten	36
7.6	Aufreinigung von Plasmiden	37
7.6.1	Plasmid-DNA-Minipräparation aus <i>E. coli</i>	37
7.6.2	Plasmid-DNA-Midipräparation aus <i>E. coli</i>	38
7.7	Restriktionsverdau und Dephosphorylierung von DNA-Enden	38
7.8	Ligation	39
7.9	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	39
7.9.1	Herstellung elektrokompeter Bakterienzellen	40
7.9.2	Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen	40
7.10	Transformation von Plasmiden in kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	41
7.10.1	Elektroporation	41
7.10.2	Chemische Transformation	41
7.11	Screening der Klone	42
7.12	DNA-Sequenzierung	42
7.13	Herstellung von Glycerinkulturen	42
8	Expression	43
9	Aufreinigung der rekombinanten Proteine	44
9.1	Aufreinigung über Affinitätschromatographie	44

9.2	Proteolytischer Verdau und weitere Aufreinigung	44
10	Polymerisationsstudien	45
11	Generierung polyklonaler Antikörper	46
12	Cleavage Assay	46
13	Elektronenmikroskopische Präparationstechniken	47
13.1	Herstellung und Kontrastierung von Suspensionspräparaten	47
13.2	Gefrierätzung	48
13.3	Herstellung von Ultradünnschnitten	49
13.3.1	Probenvorbereitung und <i>High-Pressure-Freezing</i> (HPF)	49
13.3.2	Gefriersubstitution	50
13.3.3	Infiltration und Einbettung	51
13.3.4	Herstellung pioloformbeschichteter Grids	51
13.3.5	Vorbereitung der eingebetteten Proben	52
13.3.6	Ultramikrotomie	52
13.3.7	Kontrastierung der Ultradünnschnitte	53
13.4	Immunmarkierung an elektronenmikroskopischen Präparaten	53
13.5	Immunmarkierung der Fibers in Lösung	55
13.6	Ablöseversuche	56
14	Mikroskopie	56
14.1	Phasenkontrastmikroskopie	56
14.2	Transmissionselektronenmikroskopie	57
14.2.1	Transmissionselektronenmikroskop	57
14.2.2	Elektronen-Tomographie	57
14.2.3	Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie	59
14.2.4	Bildbearbeitung und IHRSR (<i>Iterative helical real space reconstruction</i>)	59
III	ERGEBNISSE	61
1	Aufreinigung der Zellanhänge	61
1.1	Analyse der Fraktionen des CsCl-Gradienten	61
1.2	Fiber-assoziierte Strukturen der roten Fraktion des CsCl-Gradienten	63
1.3	N-terminale Sequenzierung des Filamentproteins von <i>I. pacificus</i>	66
2	Immunologische Untersuchungen	67
2.1	Immunmarkierung mittels Western Blot	67
2.2	Immunmarkierung von Fibers in Lösung	68
2.3	Immunmarkierung auf bewachsenen Goldgrids	70
2.4	Ablöseversuche	72

2.5	Immunmarkierung an Ultradünnschnitten	73
2.6	Untersuchung von Kreuzreaktionen	75
2.7	Co-Immunpräzipitation	77
3	Mikroskopische Analysen bewachsener Goldgrids	80
4	Untersuchung hypothetischer Verankerungsstrukturen der Fibers	82
4.1	Analyse von Fiber-assoziierten Komplexen	83
4.2	Tomographische Analyse der Fiber-assoziierten Komplexe	87
5	Lokalisation der Ankerstruktur der Fibers	90
5.1	Lokalisation an Ultradünnschnitten	90
5.2	Tomographie	92
5.3	Immunmarkierung der Komplexe mit rabbit anti-Ihomp1	93
6	Klonierung und Expression	95
6.1	Sequenzanalysen zu Iho670	95
6.2	Klonierung und Expression der <i>igni_0670</i> -Konstrukte	98
6.3	Klonierung und Expression von <i>igni_0668</i> incl. Immunmarkierung	101
7	Polymerisationsstudien	104
8	Cleavage Assay	108
9	Rekonstruktion des Fiberfilaments	109
IV	DISKUSSION	118
1	Lokalisation der Fiberproteine über immunologische Methoden	118
1.1	Immunmarkierung an Western Blots	118
1.2	Immunmarkierung der Fibers in Lösung und auf bewachsenen, kohlebeschichteten Goldgrids	119
1.3	Immunmarkierung an Ultradünnschnitten	122
1.4	Kreuzreaktionen mit <i>I. pacificus</i> , <i>I. islandicus</i> sowie der Co-Kultur Kin4/M	126
2	Aufbau und Struktur der Fiberfilamente	129
2.1	3D-Rekonstruktion der Fiberfilamente mit Hilfe des IHRSR-Algorithmus	129
2.2	Variabilität der Fiberstruktur als Hinweis auf unterschiedliche Fiberkonformationen	132
2.3	Polymerisationsversuche	134
3	Die Ankerstruktur der Fibers von <i>I. hospitalis</i> und Fiber-assoziierte Proteine	138
3.1	Lokalisation der Ankerstruktur	138
3.2	Fiber-assoziierte Proteine	140
3.3	Die hypothetische Verankerungsstruktur der Iho670 Fibers	140

V	ZUSAMMENFASSUNG	145
VI	ANHANG	146
1	Abkürzungsverzeichnis	146
2	Begleit-CD	148
3	Zusätzliche Abbildungen	148
VII	LITERATURVERZEICHNIS	151
VIII	PUBLIKATIONEN	169

I Einleitung

Antony van Leeuwenhoek (1632-1723), ein holländischer Kaufmann und passionierter Naturforscher, gilt heutzutage als Erfinder der ersten funktionstüchtigen Mikroskope. Ende des 17. Jahrhunderts widmete dieser Mann einen Großteil seines Lebens der Beschreibung von biologischen Objekten. So stellte er 1674 den Aufbau von roten Blutkörperchen dar, 1677 den von Spermienzellen und 1682 die Struktur der quergestreiften Muskulatur (Palm, 1982). In Proben von Teich- und Regenwasser entdeckte er kleinste Lebewesen, die er als ‚animalcules‘ beschrieb und bei welchen es sich, wie wir heute wissen, um Protozoen und Bakterien handelte. Van Leeuwenhoek war somit vermutlich der erste Mensch, der in der Lage war Bakterien mit eigenen Augen zu sehen, und wird daher von manchen Wissenschaftlern als einer der Begründer der Mikrobiologie gehandelt. Nach Betrachtung von Speichelproben in einem seiner selbst konstruierten Mikroskope, schrieb er im September 1683 Folgendes an die Royal Society in London: „I then most almost saw, with great wonder, that in the said matter there were many very little animalcules, very prettily a-moving. The biggest sort had a very strong and swift motion, and shot through the water (or spite) like a pike does through water.“ (Leeuwenhoek, 1684; vgl. Abb. I.1). Somit gelangen van Leeuwenhoek nicht nur die frühesten Beschreibungen von bakteriellen Lebensformen, er war zudem der Erste, der deren Motilität erkannte. Dennoch sollte es noch zwei Jahrhunderte dauern, bis sich die Wissenschaft für mikrobielle Fortbewegungsorgane zu interessieren begann. Ausschlaggebend dafür war ein Werk von Christian Gottfried Ehrenberg, der einen ‚fadenförmigen Rüssel‘ bei *Thiospirillum jenense* als Organ der Fortbewegung vermutete (Ehrenberg, 1838). Erste genauere Beschreibungen von bakteriellen Flagellen lieferten Cohn (1872), Dallinger und Drysdale (1875) sowie Warming (1875), welche großes Interesse hervorriefen und zu zahlreichen weiteren Untersuchungen anregten. Neuartige Verfahren wie verbesserte Färbetechniken oder die Möglichkeit, die Geißeln mit Hilfe der Dunkelfeldmikroskopie erstmals direkt zu beobachten, trieben die Forschung an prokaryotischen Zellanhängen weiter voran (Löffler, 1889; Zettnow, 1899; Reichert, 1909), welche bis zum heutigen Tag andauert.

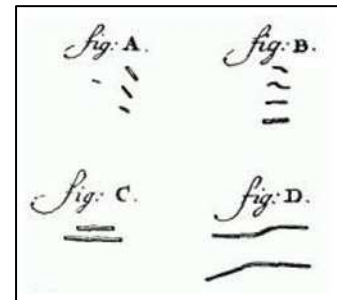


Abb. I.1: Darstellungen von ‚aminalcules‘ aus Speichelproben, Zeichnungen von van Leeuwenhoek (aus Alberts *et al.*, 2002)

Heutzutage gelten in Bezug auf bakterielle Flagellen *Escherichia coli* und *Salmonella enterica* sv. Typhimurium als die am besten untersuchten Systeme. Ein typisches bakterielles Flagellum ist dabei aus drei Bestandteilen aufgebaut: dem Filament, dem Haken sowie dem Basalkörper, der das Flagellum in der Zelle verankert (Macnab, 2003; vgl. Abb.

I.2). Die bakterielle Flagelle wird, im Gegensatz zum eukaryotischen Flagellum, über einen Rotationsmechanismus angetrieben, dessen treibende Kraft ein Protonengradient über der Cytoplasmamembran ist (Berg und Anderson, 1973; Berg, 2003). Dabei besteht der flagellare Motor aus mehreren Proteinen: MotA und MotB, welche als Stator wirken, und den sogenannten Switch-Proteinen, die die Rolle des Rotors einnehmen (Macnab, 2003). Durch einen über die Mot-Proteine vermittelten Abbau der protonenmotorischen Kraft wird ein Drehmoment erzeugt, das über den Haken an das starre Filament weitergeleitet wird und die Flagelle in Rotation versetzt (Blair, 2003). Mehr als 50 Gene sind an der Biosynthese und Funktion von bakteriellen Flagellen beteiligt, wobei ca. die Hälfte dieser Gene deren strukturelle Bestandteile codiert. Die andere Hälfte

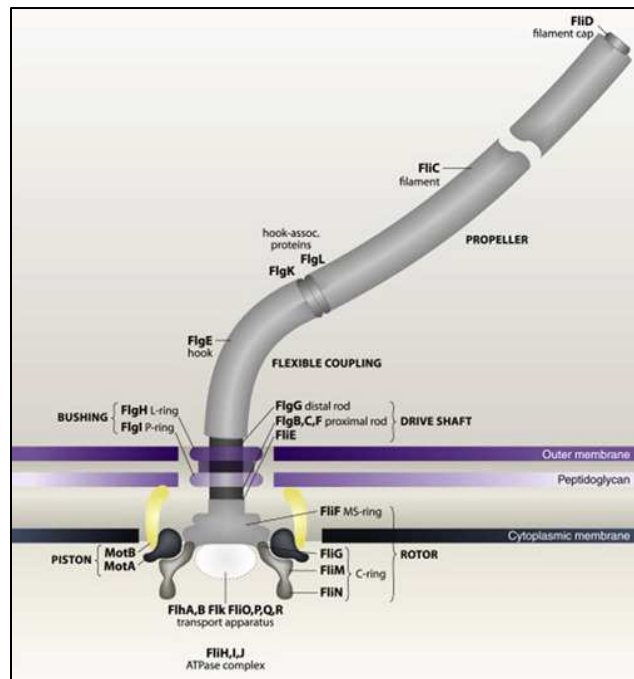


Abb. I.2: schematische Darstellung einer bakteriellen Flagelle (aus Berg, 2008)

wird entweder für den Auf- und Zusammenbau der Zellanhänge oder die Detektion und Weiterleitung von Umweltreizen gebraucht (Macnab, 2004; Liu und Ochman, 2007). Hat die bakterielle Flagelle auch die größte Aufmerksamkeit in Bezug auf prokaryotische Zellanhänge gefunden, ist doch nicht zu vergessen, dass es zahlreiche Abweichungen von diesem klassischen Typ gibt. So wären zum einen verschiedenartige laterale und polare Flagellen an ein und derselben Zelle zu nennen, zum anderen beispielsweise periplasmatische Flagellen, die in der Gruppe der Spirochaeten auftreten (Bardy *et al.*, 2003).

1990 schlugen Woese *et al.* die Einführung eines 3-Domänen-Modelles vor, welches auf vergleichenden Sequenzanalysen der 16S rRNA von verschiedenen Organismen beruhte und das bis dahin existierende 5-Reiche-Modell (Pflanzen, Pilze, Tiere, Protista und Monera) ablöste (Whittaker, 1969). Mit der Einteilung der Archaeen als eigenständige Domäne, neben den Bakterien und Eukaryoten, rückten speziell archaeelle Zellanhänge in den Fokus der Wissenschaft. Es zeigte sich, dass Flagellation innerhalb der Archaeen stark verbreitet ist und innerhalb aller Hauptgruppen auftritt, von extrem Thermophilen und Methanogenen, über verschiedene schwefelabhängige Thermophile und Hyperthermophile, bis hin zur Spezies der zellwandlosen Gattung *Thermoplasma*. Zudem findet man flagellentragende Organismen in allen Arten von Biotopen: in gesättigten Salzlösungen, in strikt anaerober

Umgebung, in extrem heißen Gebieten (z. B. bei Temperaturen $>100^{\circ}\text{C}$) sowie in Biotopen, die sich durch extreme pH-Werte (z. B. $\text{pH} < 2$) auszeichnen (Jarrell *et al.*, 1996). Ähnlich zu den bakteriellen Flagellen können auch innerhalb der Archaeen verschiedene Typen von Zellanhängen unterschieden werden (Moissl *et al.*, 2005; Thoma *et al.*, 2008; Albers und Pohlschröder, 2009), wobei das archaeelle Flagellum bisher am intensivsten untersucht wurde. Mögen sich archaeelle und bakterielle Flagellen auch auf den ersten Blick gleichen, handelt es sich doch um völlig unterschiedliche Strukturen. Zahlreiche Ähnlichkeiten finden sich allerdings zwischen archaeellen Flagellen und bakteriellen Typ IV Pili. Im Folgenden sollen nun der Aufbau der archaeellen Flagelle näher dargestellt werden sowie Vergleiche zum bakteriellen Flagellum bzw. zu den bakteriellen Typ IV Pili gezogen werden (vgl. Abb. I.2 und Abb. I.3).

Archaeelle Flagellen zeichnen sich ultrastrukturell betrachtet durch einen Filamentdurchmesser von ca. 10-13 nm aus, mit welchem sie hinsichtlich der Größenverhältnisse zwischen dem bakteriellen Flagellum, mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 20 nm, und den Typ IV Pili, mit Durchmessern im Bereich von 6 nm, liegen (Thomas *et al.*, 2001; Nudelman und Kaiser, 2004; Jones und Aizawa, 1991). Das Filament archaeeller Flagellen zeigt in den meisten Fällen einen heterogenen Aufbau aus mehreren Proteinspezies (FlaA und/oder FlaB-Proteine), welche wiederum in verschiedenen Stöchiometrien vorliegen können (Bardy *et al.*, 2004). Analoge Verhältnisse findet man bei den Typ IV Pili: auch hier ist der Schaft des Pilus aus mehreren unterschiedlichen Pilinen aufgebaut, einem Hauptpilinprotein und mehreren Pseudopilinen, die in geringerer Anzahl vorkommen (Mattick, 2002). Beim bakteriellen Flagellum hingegen bilden im Allgemeinen tausende Kopien eines einzigen Flagellins das Filament, jedoch gibt es auch hier Ausnahmen, wie beispielsweise beim Aufbau von polaren oder lateralen Flagellen. So konnten bei *Bdellovibrio bacteriovorus* mindestens fünf unterschiedliche Flagelline an definierten Stellen innerhalb des Filaments nachgewiesen werden (Idia *et al.*, 2009).

Bisher konnten in Bezug auf Flagellenbildung und Aufbau keine homologen Gene bzw. Proteine zwischen Bakterien und Archaeen gefunden werden. Es sind keine archaeellen Homologe zu Komponenten des Basalkörpers bekannt, ebenso wenig zum Haken, zu hakenassoziierten Proteinen, den Switch-Proteinen, den verschiedenen Ringsystemen, dem zentralen Stab, zu Proteinen, die am flagellenspezifischen Exportsystem beteiligt sind, oder zu den Flagellinen selbst (Faguy und Jarrell, 1999). Dem gegenüber stehen mehrere archaeelle Homologe in Bezug auf bakterielle Typ IV Pili, wie beispielsweise die archaeellen Flagelline, die den bakteriellen Pilinen bzw. Pseudopilinen ähneln. Weitere Beispiele wären eine konservierte ATPase (PilT/PilB/TadA bei Typ IV Pili, FlaI in archaeellen Flagellen), membranassoziierte Signalpeptidasen (z.B. PilD in *Pseudomonas aeruginosa* sowie FlaK/PilB in archaeellen Systemen), die als homolog zueinander angesehen werden, sowie

die konservierten Membranproteine PilC/TadB der Typ IV Pili bzw. FlaJ der archaeellen Flagellen (Jarrell *et al.*, 1996; Peabody *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2001).

Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen archaeellen Flagellen und Typ IV Pili ist das Vorhandensein von kurzen Signalpeptiden an den Flagellinen bzw. Pilinen, die von den bereits erwähnten homologen Signalpeptidasen erkannt und entfernt werden, bevor die Proteine in das Filament eingebaut werden (Ng *et al.*, 2006). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass archaeelle Preflagellin-Peptidasen denselben katalysatorischen Mechanismus anwenden wie die topologisch ähnlich angeordneten Prepilin-Peptidasen (Peabody *et al.*, 2003).

Auch in Bezug auf die N-Termini der Filamentproteine gibt es Gemeinsamkeiten zwischen bakteriellen Typ IV Pili und archaeellen Flagellen. So findet man in beiden Systemen stark hydrophobe N-Termini an den Pilinen bzw. Flagellinen vor, nachdem die Signalpeptide durch die eben beschriebenen Peptidasen entfernt werden (Albers und Pohlschröder, 2009). Dabei zeigt sich der hydrophobe Charakter dieser Abschnitte als sehr bedeutend in Bezug auf die Assemblierung der Filamente, da diese Bereiche über extrazelluläre Wechselwirkungen einen hydrophoben Kern bilden, welcher eine Art Gerüst für den Aufbau beider Zellanhangstypen darstellt (Cohen-Krausz und Trachtenberg, 2008; Craig *et al.*, 2006).

Hinsichtlich des Einbaus der prozessierten Flagelline wird bei archaeellen Flagellen ein Einbau an der Basis des wachsenden Filaments favorisiert. Dieser steht somit klar im Gegensatz zum Aufbau bakterieller Filamente, bei welchen der Einbau der Flagellinmonomere am distalen Ende des wachsenden Filaments geschieht. Dies wird durch den Aufbau des bakteriellen Filaments aus mehreren polymeren Strängen (z. B. 11 polymere Stränge bei *S. enterica* sv. Typhimurium und *E. coli*, 7 polymere Stränge im Fall von *Campylobacter jejuni*), den sogenannten Protofilamenten ermöglicht (Galkin *et al.*, 2008; Morgan *et al.*, 1995). Diese Protofilamente bestehen aus vielen Kopien des Flagellinproteins und bilden einen Kanal von ca. 2 bis 3 nm Durchmesser, durch welchen die im Cytoplasma gebildeten Flagelline geleitet werden, bevor das capping-Protein HAP2 den Einbau an der Spitze vermittelt (Inio, 1969; Morgan *et al.*, 1993; Yonekura *et al.*, 2000). Ein derartiger hohler Kanal konnte für archaeelle Flagellenfilamente bisher nicht beobachtet werden (Cohen-Krausz und Trachtenberg, 2002; Trachtenberg *et al.*, 2005).

Ein typisches Merkmal archaeeller Flagellen ist die Glykosylierung ihrer Flagelline. Dabei sind die Glykane im archaeellen System stets über N-glykosidische Bindungen an die Proteine geknüpft (Lechner und Wieland, 1989; Sumper, 1987). Eine Glykosylierung bakterieller Flagelline ist eher die Ausnahme und tritt in allen bisher beschriebenen Fällen ausnahmslos als O-glykosidische Bindung in Erscheinung (Logan, 2006). Auch bakterielle Type IV Pili können Modifikationen in Form von Glykosylierungen aufweisen, welche wie bei den bakteriellen Flagellinen O-glykosidisch geknüpft sind (Ng *et al.*, 2006).

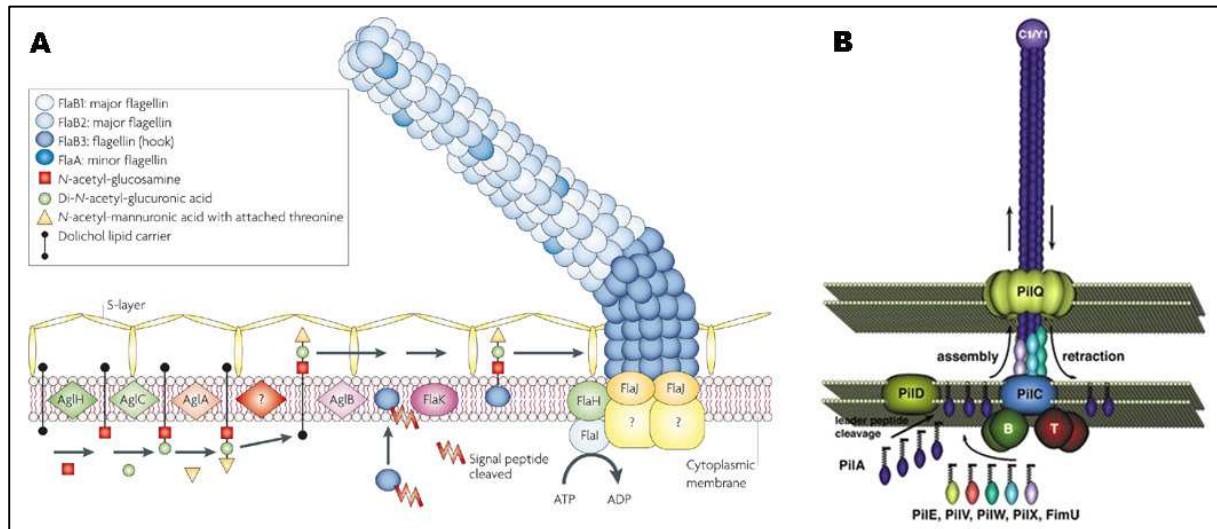


Abb. I.3: schematische Darstellung der Assemblierung der A: archaeellen Flagelle (aus Jarrell und McBride, 2008) und B: der bakteriellen Type IV Pili (aus Clausen *et al.*, 2009)

Bis zum heutigen Tag ist der Assemblierungsmechanismus der archaeellen Flagelle nicht genau geklärt und Gegenstand aktueller Forschung. Die zuvor genannten Punkte weisen darauf hin, dass sich der Mechanismus deutlich von dem der bakteriellen Flagelle unterscheidet. Es besteht die Möglichkeit, dass für archaeelle Flagellen ein völlig neuer Assemblierungsweg entdeckt wird, wenngleich man vom heutigen Wissensstand eher von einem Mechanismus ausgeht, der dem der Typ IV Pili gleicht (Bardy *et al.*, 2004; vgl. Abb. I.3). In diesem hypothetischen Model der Flagellenassemblierung werden die im Cytoplasma gebildeten Preflagelline von Chaperonen gebunden, um eine Aggregation ihrer hydrophoben N-Termini und somit eine vorzeitige Verklumpung zu verhindern (Polosina *et al.*, 1998). Die Monomere werden an die Innenseite der Cytoplasmamembran geleitet, wo das Signalpeptid der Preflagelline von der membranständigen Preflagellin-Peptidase FlaK/PibD abgespalten wird. Im Anschluss erfolgt eine posttranslationale Glykosylierung der Flagelline durch Enzyme, die an der Außenseite der Cytoplasmamembran lokalisiert sind (Sumper, 1987), bevor die reifen Flagelline in die Basis des Filaments eingebaut werden. Im Falle von *Methanococcus vannielii* und *M. voltae* handelt es sich dabei um die Flagelline FlaB1 und FlaB2, die die Hauptkomponenten des Filaments bilden (Thomas *et al.*, 2001); in Filamenten von *Halobacterium salinarum* dagegen wurden fünf Flagelline (FlagA1, FlagA2, FlagB1, FlagB2 und FlagB3) gefunden, welche das Filament aufbauen (Gerl *et al.*, 1989). Die genaue Reihenfolge der Assemblierungsschritte ist jedoch immer noch unklar, ebenso wie die Rolle der weiteren bereits identifizierten, flagellenassoziierten Proteine FlaC/D/E/F/G und FlaH. Möglicherweise sind sie Teil einer Struktur, die bisher nicht zu isolieren ist, oder sie sind nur temporär an der Flagellenbildung, z. B. in einer Funktion als Gerüstprotein, beteiligt (Thomas und Jarrell, 2001). Etwas mehr ist über die Proteine FlaI und FlaJ bekannt. So wurde 2005 von Albers und Driessen eine ATPase Aktivität für FlaI nachgewiesen, wodurch

angenommen wird, dass dieses Protein als Energielieferant für die Assemblierung oder als eine Art Motorprotein wirken könnte. FlaJ hingegen stellt ein konserviertes Protein der Cytoplasmamembran dar, zudem wird vermutet, dass es mit FlaI interagieren kann (Ng *et al.*, 2006).

Eine funktionelle Zuordnung der flagellenassoziierten Proteine gestaltet sich nach wie vor schwierig. Dies dürfte nicht zuletzt daran liegen, dass über den archaeellen Verankerungsmechanismus der Flagelle in der Zelle nur rudimentäre Daten vorliegen. Man geht davon aus, dass Archaeen aufgrund ihrer speziellen Zellwandstruktur andere Verankerungsmechanismen für ihre Flagellen besitzen als Bakterien. Das dürfte einer der Gründe dafür sein, dass momentane Isolationsmethoden für archaeelle Flagellen, die sich oft an Protokolle für die Isolation bakterieller Flagellen anlehnen, keine befriedigenden Ankerstrukturen anreichern konnten. Bisher konnten lediglich knopfartige Strukturen bei einigen *Methanococcus*-Spezies (Bardy *et al.*, 2002; Kalmokoff *et al.*, 1988) und extrem halophilen Organismen (Jaschke *et al.*, 1994; Kupper *et al.*, 1994) isoliert werden. Äquivalente zu den gut definierten bakteriellen Ringen oder dem zentralen Stab konnten nicht beobachtet werden. Erste vage Beschreibungen über einen möglichen Verankerungsmechanismus wurden 1994 von Kupper *et al.* vorgeschlagen. Diese postulierten eine sogenannte ‚polar cap‘ als Insertionspunkt der Flagellen von *H. salinarum*, wobei unklar ist, ob diese Struktur Bestandteil der Zellwand, der Zellmembran oder des Cytoplasmas ist. Eine ‚scheibenförmige lamellare Struktur‘ wird von Speranskii *et al.* (1996) beschrieben. Die Autoren konnten in diesem Zusammenhang an den Zellpolen von *H. salinarum* eine plateauartige, intrazelluläre Struktur unterhalb der Cytoplasmamembran beobachten, von welcher die Flagellen ausgehen bzw. in welcher sie inseriert sein sollen; eine genauere Analyse dieser hypothetischen Ankerstruktur fehlt allerdings auch hier bis jetzt.

Archaeelle Flagellen werden in erster Linie als Motilitätsorganelle beschrieben und gelten in allen Gruppen der Archaeen als weit verbreitet. Dennoch beschränken sich Studien in den meisten Fällen auf Vertreter der Methanogenen und Halophilen (Thomas *et al.*, 2001). Näther *et al.* entdeckten 2006 neue Funktionen von archaeellen Flagellen und zeigten, dass es sich bei den Flagellen von *Pyrococcus furiosus* um multifunktionelle Organelle handelt, die nicht nur für deren Fortbewegung, sondern auch für Adhäsion an Oberflächen und zur Bildung von Zell-Zell Kontakten genutzt werden können. Mag die archaeelle Flagelle zwar das am weitesten verbreitete Zellanhangsorganell sein, so ist es doch keineswegs das Einzige. Folgende Beispiele sollen dazu dienen die Vielfalt von archaeellen Zellanhängen näher darzustellen, die sich mit fortschreitender Untersuchung innerhalb der Domäne der Archaeen sicher noch erweitern wird.

Eine der strukturell auffälligsten Zellanhänge dürften sicherlich die Hami (vgl. Abb. I.4) darstellen, die 2005 von Moissl *et al.* beschrieben wurden. Diese Strukturen wurden an SM1 Euryarchaeon beobachtet, welches 2001 im Sippenauer Moor in der Nähe von Regensburg entdeckt wurde (Rudolph *et al.*, 2001). SM1 Euryarchaeon lebt dort in Gemeinschaft mit Bakterien in kaltem, sulfidhaltigem Sumpfwasser und bildet pro Zelle in etwa 100 Hami aus. Diese ca. 2 μm langen Filamente zeigten in elektronenmikroskopischen Untersuchungen eine einzigartige Organisation, die sich von der Basis zum distalen Ende hin unterscheidet. Jeder der 7-8 nm dicken Hami kann dabei in zwei Regionen unterteilt werden. Der erste Abschnitt ist die sogenannte *prickle region*, die den zentralen Part darstellt. Dort gehen pro Filament in etwa 60 stachelförmige Fortsätze ab, die in regelmäßigen Abständen von ca. 46 nm angeordnet sind. Am Ende der Zellanhänge findet sich die rund 152 nm lange *hook region*, welche keine Stacheln aufweist und in drei hakenförmigen Strukturen mündet, die an ihren Enden verdickt sind und an einen Angelhaken erinnern. Funktionell werden die Hami als Adhäsionsorganell beschrieben, die es SM1 Euryarchaeon ermöglichen sowohl an andere Zellen, als auch an unterschiedliche Oberflächen anzuheften (Moissl *et al.*, 2003; Moissl *et al.*, 2005).

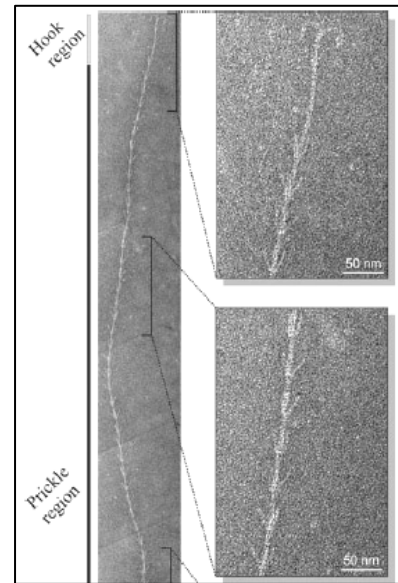


Abb. I.4: EM-Aufnahme eines Hamus, Negativkontrastierung (aus Moissl *et al.*, 2005)

Eine weitere Art archaeller Zellanhänge stellen Fimbrien oder Pili dar, welche für eine Vielzahl von Archaeen beschrieben werden konnten (Doddema *et al.*, 1979; Koval und Jarrell, 1987; Thoma *et al.*, 2008). Die Bezeichnung Fimbrie/Pili ist meist nicht klar definiert, beschreibt jedoch im Allgemeinen Strukturen, die sich durch ihren kleineren Durchmesser von ca. 4-5 nm von den archaellen Flagellen unterscheiden. Erst vor kurzem wurden detailliertere Beschreibungen von archaellen Fimbrien veröffentlicht, die erstmals biochemische, genetische und funktionelle Aspekte dieser Strukturen analysierten (Thoma *et al.*, 2008; VanDyke *et al.*, 2008; Fröls *et al.*, 2007; Zolghadr *et al.*, 2010). So zeigte sich, dass die Fimbrien von *Methanothermobacter thermoautotrophicus* aus dem Genprodukt von *mth60* bestehen, welches ein 16 kDa großes Glykoprotein darstellt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Zellen von *M. thermoautotrophicus*, die auf festen Oberflächen anheften, mehr Pili bilden, als Zellen, die in Flüssigkultur gezogen wurden (Thoma *et al.*, 2008). Diese Beobachtung sowie die Tatsache, dass eine Zugabe spezifischer Antikörper gegen dieses Fimbrin eine Ablösung adhärenter Zellen bewirkte, zeigt, dass die Mth60 Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* als funktionelle Adhäsine anzusehen sind.

Bei der letzten Art von archaeellen Zellanhängen, die hier erwähnt werden soll, handelt es sich um die so genannten Cannulae, die bei Vertretern der Gattung *Pyrodictium* beschrieben wurden (Rieger *et al.*, 1995) und welche dort, neben den Flagellen, als weiterer Zellanhangstyp vorkommen (vgl. Abb. I.5). Diese Cannulae sind hohle Röhren mit einem äußeren Durchmesser von ca. 25 nm, die aus drei homologen Glykoproteinen aufgebaut sind. Kommt es zur Zellteilung, bleiben die neu entstandenen Tochterzellen über Cannulae in Verbindung (Horn *et al.*, 1999), so dass mit der Zeit ein dichtes Netzwerk von Zellen und Cannulae entsteht. Cryo-Elektronenmikroskopische Untersuchungen wiesen darauf hin, dass diese Verbindungen auf periplasmatischer Ebene bestehen (Nickell *et al.*, 2003). Über die Funktion der Cannulae kann seither nur spekuliert werden. Nickell *et al.* (2003) ver-

muteten ein mögliches interzelluläres Transportsystem, das es den Zellen ermöglicht Moleküle wie Peptide oder Proteine, Metaboliten, Signalmoleküle oder sogar genetisches Material auszutauschen. Allerdings weiß man bis heute nur sehr wenig über den Diffusionsmechanismus und die zugrundeliegende Kinetik innerhalb der Cannulae.

Mit der Entdeckung der Gattung *Ignicoccus* im Jahre 2000 durch Huber *et al.* konnten Organismen isoliert werden, die eine einzigartige Zellhülle aufweisen. Die drei beschriebenen Vertreter dieser Gattung, *Ignicoccus islandicus*, *I. pacificus* und *I. hospitalis*, zeichnen sich durch den Besitz einer äußeren Membran aus, die seither als einmalig innerhalb der Archaeen gilt (Rachel *et al.*, 2002; Näther und Rachel, 2004; Paper *et al.*, 2007). Mit Hilfe von 16S rRNA-Analysen konnten sie der Familie der *Desulfurococcaceae*, innerhalb der Ordnung der *Desulfurococcales* zugeordnet werden, welche innerhalb der Archaeen zum Reich der Crenarchaeota gehört.

I. hospitalis zeichnet sich dabei durch eine einmalige Assoziation mit *Nanoarchaeum equitans* aus, das den ersten beschriebenen und kultivierbaren Vertreter des Phylums Nanoarchaeota darstellt (Huber *et al.*, 2003). Beide wachsen bei einer optimalen Temperatur von 90°C unter strikt anaeroben Bedingungen bei einem optimalen pH von 5,5-6,0.

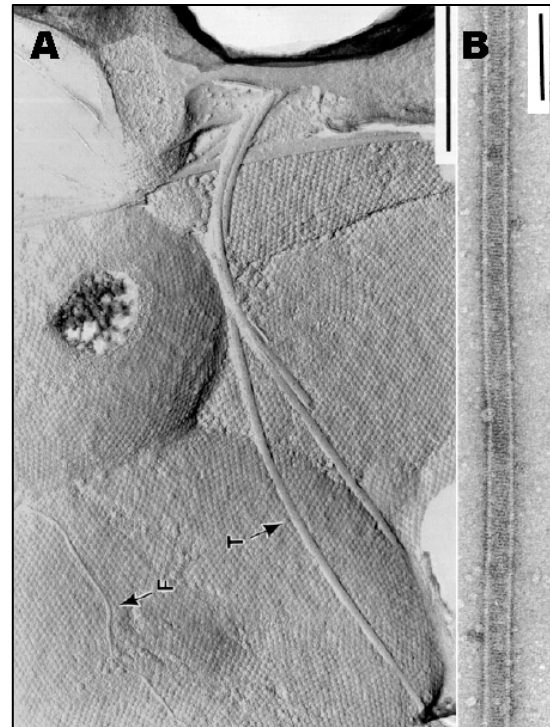


Abb. I.5: EM-Aufnahme von A: *Pyrodictium*-Zellen nach Gefrierätzung mit Flagellen (F) und Cannulae (T), Balken: 0,5 µm; B: Cannulae, negativkontrastiert, Balken 100 nm (aus Rieger *et al.*, 1995)

Die Zellen von *I. hospitalis* (vgl. Abb. I.6) erscheinen mikroskopisch betrachtet als regelmäßige oder unregelmäßige Kokken mit einem Durchmesser von 1-4 µm, die einzeln oder in Paaren vorkommen. Es handelt sich um chemolithoautotrophe Organismen, die ihre Energie durch Reduktion von elementarem Schwefel, mit Wasserstoff als Elektronendonator, ziehen und Schwefelwasserstoff als Stoffwechselendprodukt bilden. Ultradünnschnitte von *I. hospitalis* offenbaren ein dicht gepacktes Cytoplasma, das von einer Membran umschlossen wird. Als weiteres Kompartiment konnte ein großer periplasmatischer Raum mit Breiten zwischen 20 und 500 nm identifiziert werden, in welchem sich ein hoch dynamisches Membransystem befindet, das aus Vesikeln, tubulären Strukturen und Ausläufern des Cytoplasmas besteht (Rachel *et al.*, 2002; Junglas *et al.*, 2008; Heimerl, 2009).

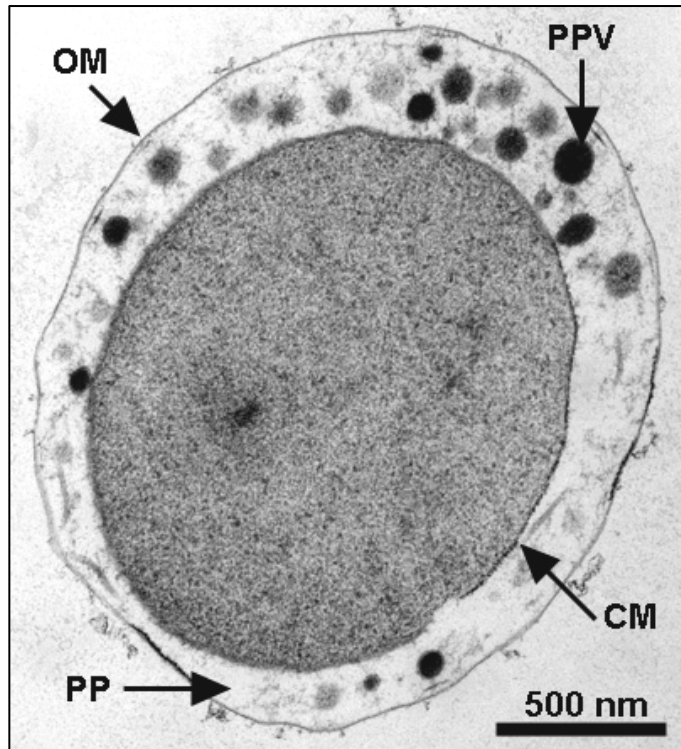


Abb. I.6: Ultradünnschnitt von *I. hospitalis*, gewachsen in Cellulosekapillaren, nach HPF und FS ($\text{OsO}_4/\text{H}_2\text{O}/\text{A}$); OM: äußere Membran (outer membrane), CP: Cytoplasma, PP: Periplasma, CM: Cytoplasmamembran, PPV: periplasmatisches Vesikel (aus Heimerl, 2009)

Als äußerste Hüllschicht dient eine äußere Membran, welche aus Lipiden (überwiegend Derivate von Archaeol) und Proteinen besteht, wobei Ihomp1 als dominierende Proteinspezies identifiziert werden konnte (Burghardt *et al.*, 2007). Zudem wurde das Vorkommen von bis zu neun flagellenähnlichen Zellanhängen pro Zelle beschrieben, welche von einem Zellpol ausgehen (Paper *et al.*, 2007). *Life cell imaging*-Experimente mit Hilfe des Thermomikroskops sollten Motilitätsstudien unter anaeroben Verhältnissen bei einer Temperatur von 90°C ermöglichen, was den optimalen Wachstumsbedingungen von *I. hospitalis* entspricht. In derartigen Versuchen konnte allerdings keine Motilität von *I. hospitalis* nachgewiesen werden (Müller *et al.*, 2009). Daniel Müller gelang es im Verlauf seiner Diplomarbeit das Hauptprotein dieser Zellanhänge zu isolieren (Müller, 2005). Dabei handelt es sich um ein ca. 33 kDa großes Protein, welches als Genprodukt von *igni_0670* gebildet und als Iho670 bezeichnet wird. Bioinformatische Analysen mit Iho670 zeigten keine Homologien zu archaeellen Flagellinen, Fimbrien- oder Hamusproteinen, den Proteinen der Cannulae oder zu anderen Proteinen. Die Zellanhänge von *I. hospitalis* stellen somit einen

neuen Typ von archaeellen Zellanhängen dar und wurden, um sie klar von Fimbrien und Flagellen abzugrenzen, als Fibers (Singular: Fiber) bezeichnet (Müller *et al.*, 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun weitere Erkenntnisse über die Fibers von *I. hospitalis* gewonnen werden. Immunlokalisationsstudien sollten dazu dienen, eine genaue Lokalisation des Fiberproteins Iho670 an den Zellanhängen als auch innerhalb der Zelle zu ermöglichen. Zudem sollten Kreuzreaktionen mit den anderen Vertretern dieser Gattung sowie der Co-Kultur Kin4/M, bestehend aus *I. hospitalis* und *N. equitans*, durchgeführt werden. Die Frage nach der Verankerung der Zellanhänge war von ebenso großem Interesse, wie die Identifikation von weiteren Fiber-assoziierten Strukturen. Polymerisationsexperimente mit rekombinanten Fiberproteinen sollten einen Aufschluss über die Bedeutung bestimmter Domänen innerhalb des Fiberproteins geben sowie tiefere Einblicke in den Assemblierungs- bzw. Polymerisationsmechanismus der Fibers gewähren. Eine funktionelle Analyse der Fibers wurde ebenso angestrebt, wie eine Identifikation weiterer, am Aufbau bzw. der Prozessierung der Fibers beteiligten Proteine. Cryo-Elektronenmikroskopische Analysen sowie computergestützte Rekonstruktionsprogramme sollten zudem eine dreidimensionale Darstellung des Fiberfilaments von *I. hospitalis* ermöglichen und durch eine hohe Auflösung Rückschlüsse über die Anordnung der Iho670-Untereinheiten innerhalb des Filaments zulassen.

II Material und Methoden

1 Substanzen und Bezugsquellen

1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid-Fertiglösung (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Oldendorf
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau (BPB)	Serva, Heidelberg
BSA, Fraktion V	Sigma, St. Louis (USA)
Cäsiumchlorid	Biomol Hamburg
Coomassie Blue G 250	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol	Sigma, Steinheim
Dodecenybernsteinsäureanhydrid (DDSA)	Fluka, Buchs (CH)
Epoxy-Einbettmittel	Fluka, Buchs (CH)
Ethanol; p.a.	Baker, Deventer (NL)
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Gelatine	Sigma, Steinheim
Glutardialdehyd	Fluka, Buchs (CH)
Glycerin	Fluka, Buchs (CH)
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel de Haën, Seelze
Magermilchpulver	TSI, Zeven
MES	Sigma, Steinheim
Methylnadic Anhydrid (MNA)	Fluka, Buchs (CH)
Na ₂ EDTA	Sigma, Steinheim
Natriumdisulfit	Sigma, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Sigma, Steinheim
NBT/BCIP Stock Solution	Roche, Mannheim
Phenol und Phenolgemische	MP Biomedicals, Illkirch (F)
Pioloform	Plano, Wetzlar
PMSF	Roth, Karlsruhe
2-Propanol; p.a.	Acros, New Jersey (USA)
Resazurin	Serva, Heidelberg
Schwefel	Riedel de Haën, Seelze
SDS	Serva, Heidelberg
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
TEMED	Sigma, St. Louis (USA)
Tricin; p.a.	Roth, Karlsruhe
Tridimethylaminomethylphenol (DMP-30)	Fluka, Buchs (CH)

Tris; p.a.	USB, Cleveland (USA)
Tween 20	Serva, Heidelberg
Uranylacetat	Fluka, Buchs (CH)

Alle weiteren Substanzen wurden von der Firma Merck, Darmstadt in p.a. Qualität bezogen. Alle für die Kultivierung verwendeten Gase stammten von der Firma Linde Technische Gase, Nürnberg.

1.2 Molekularmassenstandards

Protein-Massenstandard	Hersteller
PageRuler™ Unstained Protein Ladder; SM0661	Fermentas, St.Leon-Rot
PageRuler™ Prestained Protein Ladder; SM0671	Fermentas, St.Leon-Rot

DNA-Längenstandard	Hersteller
1kb DNA Ladder; N3232	New England Biolabs, Frankfurt am Main
100bp DNA Ladder; N3231	New England Biolabs, Frankfurt am Main

1.3 Enzyme/kommerzielle Puffer

Enzym/kommerzieller Puffer	Hersteller
10x Antarctic Phosphatase Reaction Buffer; B0289S	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Antarctic Phosphatase (5 U/μl); M0289S	New England Biolabs, Frankfurt am Main
BamHI (20 U/μl); R0136S	New England Biolabs, Frankfurt am Main
FspI (5 U/μl); R0135	New England Biolabs, Frankfurt am Main
dNTP-Mix; NTPMX100, each 10 mM	Qbiogene, Heidelberg
10x NEBuffer 1/2/3/4; B7001/2/3/4S	New England Biolabs, Frankfurt am Main
NdeI (20 U/μl); R0111S	New England Biolabs, Frankfurt am Main
KpnI (10 U/μl); R0142S	New England Biolabs, Frankfurt am Main
MluI (10 U/μl); ER0562	Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion DNA Polymerase (2 U/μl); F530	Finnzymes, Espoo (FIN)
5x Phusion HF Buffer; F518	Finnzymes, Espoo (FIN)

Proteinase K	Roth, Karlsruhe
PvuI (10 U/μl); R0150S	New England Biolabs, Frankfurt am Main
RNase A	Serva, Heidelberg
SmaI (10 U/μl); ER0661	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase (400 U/μl); M0202S	New England Biolabs, Frankfurt am Main
10x T4 DNA Ligase Buffer; B0202S	New England Biolabs, Frankfurt am Main
10 x Tango Buffer; BY5	Fermentas, St. Leon-Rot
Thrombin; T6200	Sigma, Taufkirchen
Trypsin	Roche, Mannheim
XbaI (10 U/μl); ER0562	Fermentas, St. Leon-Rot
XcmI (5 U/μl); R0135	New England Biolabs, Frankfurt am Main
XhoI (10 U/μl); ER0691	Fermentas, St. Leon-Rot

1.4 PCR-Primer

Primerbezeichnung	Sequenz (5' 3')	Hersteller
Igni_0670_for_NdeI	CAT ATG GTC TCC CCC GTA ATA GCG	Metabion GmbH/Martinsried
Igni_0670_rev_KpnI	GGT ACC CGT TAT GCT GAG AGG TAC	Metabion GmbH/Martinsried
Igni_0670kurz_for_NdeI	CAT ATG GTC AGC GGG CTG AGC	Metabion GmbH/Martinsried
Igni_0670_rev_XhoI	CTC GAG CGT TAT GCT GAG AGG TAC	Metabion GmbH/Martinsried
Igni_0668_for_NdeI	CAT ATG GTT AAT ACC ACC GTA GGG AG	Metabion GmbH/Martinsried
Igni_0668_rev_XhoI	CTC GAG GAT GAG CCC GCC G	Metabion GmbH/Martinsried
Igni_0669mitte_for	AGT CAA GGT TAT GGG GGC GAA GA	Metabion GmbH/Martinsried

1.5 Vektoren

Vektorbezeichnung	Resistenz	Hersteller
pJoe	Ampicillin	Altenbuchner Josef, Universität Stuttgart
pET Expressionssystem 29b	Kanamycin	Novagen, Madison, USA

1.6 Antikörper

Primärer Antikörper	Hersteller
mouse anti-His	Sigma, Taufkirchen
rabbit anti-LPC	Davids Biotechnologie, Burgweinting
rabbit anti-Iho670	Davids Biotechnologie, Burgweinting
rabbit anti-Ihomp1	Davids Biotechnologie, Burgweinting
Testserum rabbit anti-Iho668 _{rek}	Davids Biotechnologie, Burgweinting
Testserum chicken anti-Iho668 _{rek}	Davids Biotechnologie, Burgweinting

Sekundärer Antikörper	Hersteller
anti-mouse IgG + Meerrettich Peroxidase	Sigma, Taufkirchen
goat anti-rabbit IgG + Ultra-small Gold	Aurion, Wageningen (NL)
goat anti-rabbit IgG + 6 nm Gold	Aurion, Wageningen (NL)
goat anti-rabbi IgG + alkalische Phosphatase	Sigma, Taufkirchen

1.7 Organismen

Organismus	Stamm	Kultursammlung	Herkunft	Literatur
Reinkulturen:				
<i>Ignicoccus hospitalis</i>	KIN4/I	BBR 17/12/4	Kolbeinsey-Rücken	Paper <i>et al.</i> , 2007
<i>Ignicoccus islandicus</i>	KOL8	BBR 17/10/1	Kolbeinsey-Rücken	Huber <i>et al.</i> , 2000
<i>Ignicoccus pacificus</i>	LPC33	BBR 17/102	pazifischer Graben	Huber <i>et al.</i> , 2000
Co-Kultur:				
<i>Ignicoccus hospitalis</i> und <i>Nanoarchaeum equitans</i>	KIN4/M	BBR 17/10/4	Kolbeinsey-Rücken	Huber <i>et al.</i> , 2002

Organismus	Stamm	Herkunft
<i>Escherichia coli</i>	DH10B	Invitrogen, Darmstadt
<i>Escherichia coli</i>	Rosetta(DE3)pLysS	Novagen, Madison, USA

2 Kulturmedien

2.1 ½ SME-Medium (Stetter *et al.*, 1983; modifiziert Huber *et al.*, 2003)

2.1.1 Zusammensetzung des ½ SME-Kulturmediums

Sämtliche *Ignicoccus*-Kulturen als auch die Co-Kultur aus *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans* wurden unter strikt anaeroben Bedingungen in ½ SME-Medium kultiviert.

Substanz	Menge/Liter
NaCl	13,85 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3,5 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,75 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,38 g
KCl	0,33 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,25 g
NaBr	0,05 g
H ₃ BO ₃	0,02 g
NaHCO ₃	0,16 g
SrCl ₂ x 6 H ₂ O	15 mg
KJ-Lösung 0,1 % (w/v)	25 µl
Schwefel	10,0 g
Resazurin 0,1 % (w/v)	1 ml
Na ₂ S x 7-9 H ₂ O	0,5 g
H ₂ O _{millipore}	ad 1000 ml

2.1.2 Herstellung der Kulturmedien zur Kultivierung in Serumflaschen

Alle Salze, mit Ausnahme von Na₂S, die Kaliumiodid-Lösung und der Schwefel wurden in eine 1 Liter-Duranglasflasche eingewogen und in ca. 600 ml H₂O_{millipore} gelöst. Nach Homogenisierung des Schwefels mit Hilfe eines Ultra-Turrax (T25, IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau) wurde der Redoxfarbstoff Resazurin zugegeben und der Ansatz mit

H₂O_{millipore} auf 1000 ml aufgefüllt. Die mit einem Gummistopfen und einer durchbohrten Schraubkappe verschlossenen Duranglasflaschen wurden im Anschluss ca. 30 Min. unter Druckausgleich mit N₂/CO₂ (80:20; v/v) durchgast, um den im Medium vorhandenen Sauerstoff weitestgehend auszutreiben. Etwaige Rückstände wurden durch Zuspritzen von Na₂S (gelöst im 1 ml H₂O_{millipore}) reduziert und der pH-Wert durch Zugabe von 50%iger (v/v) H₂SO₄ auf 5,5-6 eingestellt. Die Portionierung des Mediums erfolgte in einer Anaerobenkammer (Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake Michigan, USA), wo die Kulturflaschen (Natronkalksilikatglas, Stute GmbH, Rheinbach) mit je 20 ml Medium befüllt und mit Gummistopfen (DIN 12871, Laborcenter Nürnberg) luftdicht verschlossen wurden. Nach dem Ausschleusen wurden die Serumflaschen mit Aluminiumringen (Bellco Glass, New Jersey, USA) gesichert und das Kammergas (N₂/H₂, 95:5, v/v) gegen ein Gemisch von H₂/CO₂ (80:20, v/v) ausgetauscht. Dazu wurden die Serumflaschen jeweils dreimal evakuiert und das neue Gasgemisch mit einem Überdruck von 1,6 bar aufgepresst.

2.1.3 Medienzusätze

Um die Kultivierung von verschiedenen *Ignicoccus*-Ansätzen zu fördern wurden 1%iger und 10%iger Hefe- bzw. Fleischextrakt als Medienzusätze verwendet. Für deren Herstellung wurden 0,25 g (bzw. 2,5 g) Hefe- bzw. Fleischextrakt in 25 ml H₂O_{millipore} gelöst und der Ansatz in Serumflaschen abgefüllt, welche mit einem Gummistopfen und einem Aluminiumring verschlossen wurden. Der Sauerstoff wurde über eine 30minütige Durchgasung mit N₂ unter Druckausgleich ausgetrieben bevor die Medienzusätze sterilisiert werden konnten.

2.2 Luria-Bertani-Medium (LB-Medium; Miller, 1972)

2.2.1 Zusammensetzung des LB-Mediums

Substanz	Menge/Liter
Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
H ₂ O _{millipore}	ad 1000 ml

2.2.2 Herstellung als Flüssigmedium und Gussplatten

Alle Bestandteile des LB-Mediums wurden abgewogen und in Duranglasflaschen unter Zugabe von 1000 ml H₂O_{millipore} gelöst. Zur Herstellung von Gussplatten wurde dem Medium zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

Eine Sterilisation erfolgte wie unter Kap. II.3 beschrieben. Je nach Bedarf wurden dem Medium nach der Sterilisation und einem Abkühlen auf mindestens 55°C sterilfiltrierte Antibiotikallösungen folgender Endkonzentrationen zugesetzt:

Substanz	Endkonzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Chloramphenicol	34 µg/ml

Für die Gussplatten wurden nach dem Autoklavieren und der Antibiotikazugabe je 15 ml flüssige LB-Agar-Lösung in Plastikpetrischalen gegossen und diese bis zum Erstarren abgekühlt.

3 Sterilisation

Nicht schwefelhaltige Medien, Medienzusätze sowie hitzeunempfindliche Puffer und Lösungen wurden unter feuchter Hitze für 20 Min. bei 121°C autoklaviert (5050 ELV, Tuttnauer, Breda, Niederlande). Eppendorf-Reaktionsgefäße (ERG), Pipettenspitzen, Spritzen incl. Kanülen sowie Glaswaren wurden unter analogen Bedingungen für 40 Min. autoklaviert und im Trockenschrank (T 6200, Heraeus, Hanau) getrocknet. Das schwefelhaltige ½ SME-Medium wurde unter feuchter Hitze für 60 Min. bei 110°C sterilisiert (Sanoclav, LAM-20L, Bad Überkingen).

4 Kultivierung der Organismen

4.1 Kultivierung in Serumflaschen

Zum Animpfen der Medien wurden 0,2 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur mit Hilfe einer Einmalspritze steril in frisches Medium überimpft. Die bewachsene Kultur wurde dabei langsam, unter Vermeidung von Sauerstoffzufuhr, in die Flüssigphase des frischen Mediums

gespritzt. In manchen Fällen wurden zusätzlich vorgewärmte Medienzusätze in der gewünschten Konzentration zugegeben. Die Kulturen wurden liegend, bei 90°C unter leichtem Schütteln bei ca. 50 Upm im Heißluftinkubator (T5090, Heraeus, Kendro® Laboratory Products GmbH, Langenselbold) inkubiert, bis die gewünschte Zellzahl erreicht war. Um eine optimale Anzucht zu gewährleisten, wurde darauf geachtet, dass das Wachstumsverhalten der Zellen nicht durch unnötige Abkühlphasen beeinträchtigt wird. Dementsprechend wurden Kontrollproben direkt und zügig am Inkubator entnommen.

4.2 Kultivierung in Cellulosekapillaren

Um einen bestmöglichen Erhalt der Feinstruktur der *Ignicoccus*-Zellen zu gewährleisten wurden Zellen in Cellulosekapillaren (Gambro Hospal GmbH, Planegg-Martinsried) angezogen. Zu diesem Zweck wurden Cellulosekapillaren auf eine Länge von ca. 1,5 cm zurechtgeschnitten. Im nächsten Schritt wurde 1 ml einer logarithmisch wachsenden Vorkultur steril entnommen und unter einer Argon-Schutzatmosphäre in eine Plastikpetrischale überführt. Ein Ende der Cellulosekapillare wurde in die Zellsuspension getaucht, so dass sich die Kapillare durch Kapillarkräfte vollsaugte. Dies wurde durch ein Stück Filterpapier, das an das andere Ende der Kapillare gehalten wurde, überprüft. Die befüllten Kapillaren wurden durch kurzes Eintauchen in einen Tropfen Sekundenkleber (UHU plus, 2-Komponenten-Epoxidharz-Kleber, UHU GmbH, Bühl) verschlossen und etwaige Zellen, die sich an der Außenseite der Kapillare befanden, durch Abspülen mit einem kleinen Volumen $\frac{1}{2}$ SME-Medium entfernt. Im nächsten Schritt wurden je drei befüllte Kapillaren, ebenfalls unter der Argon-Schutzatmosphäre, in Serumflaschen mit frischem $\frac{1}{2}$ SME-Medium transferiert und diese mit einem Gummistopfen und einem Aluminiumring verschlossen. An der Gasstation erfolgte der Gasaustausch gegen H_2/CO_2 wie unter Kap. II.2.1.2 beschrieben. Es war darauf zu achten, dass sich die Kapillaren stets in der Flüssigphase des Mediums befanden. Die Inkubation der Kulturen erfolgte liegend bei 90°C im Heißluftinkubator. Um das Wachstum der Organismen zu verbessern wurde manchen Ansätzen 0,1 % Hefeextrakt als Medienzusatz zugegeben.

4.3 Anzucht auf kohlebeschichteten Goldgrids

Eine weitere Möglichkeit Mikroorganismen zu kultivieren war die Anzucht auf elektronenmikroskopischen Trägernetzchen (Rieger, 1998). Diese Methode stellt eine sehr schonende Technik dar, da die bei der nachfolgenden Präparation auftretenden Scherkräfte (durch Pipettier- oder Zentrifugationsschritte) vermieden werden und die Zellanhänge weitestgehend unbeschädigt erhalten bleiben.

Im ersten Schritt mussten hierfür kohlebeschichtete Goldgrids (G2400A, Plano, Wetzlar) hydrophilisiert (Plasma Cleaner/Sterilizer PDC-3XG, Harrick Plasma, Ithaca, USA) und in einen Teflonhalter (Eigenbau der Biologie-Werkstatt der Universität Regensburg) transferiert werden. Die Oberfläche der Grids wurde mit einem Tropfen $\frac{1}{2}$ SME-Medium benetzt bevor der Teflonhalter unter einer Argonschutzatmosphäre in eine Serumflasche mit $\frac{1}{2}$ SME-Medium eingebracht und die Serumflasche erneut verschlossen wurde. Nachdem die Serumflaschen an der Gasstation mit einem Gasgemisch aus H_2/CO_2 (80:20, v/v) begast wurden, wurden sie auf 90°C vorgewärmt und mit einer logarithmisch wachsenden Kultur von *Ignicoccus*-Zellen beimpft. Die Inkubation der Kulturen erfolgte wie unter Kap. II.4.1 beschrieben.

5 Isolation und Aufreinigung von Zellanhängen

Zur Isolation der Zellanhänge von *I. hospitalis* wurde der Fermentationsüberstand herangezogen, der bei Fermentationen zur Gewinnung großer Zellmassen von *I. hospitalis* als Abfallprodukt anfiel. Die Kultivierung in Bioreaktoren erfolgte dabei wie in Küper *et al.* (2010) beschrieben unter Zugabe von 0,1 % Hefeextrakt. Nach der Zellernte standen zwei Überstände zur Präparation der Zellanhänge zur Verfügung. Bei den ersten ca. 300 Litern (Überstand 1) handelte es sich um Überstand, der aus der ersten Erntezentrifugation mit einer Padberg-Erntezentrifuge (Typ CEPA Z41-G, Padberg, Lahr, Schwarzwald) abgetrennt wurde. Überstand 2 (ca. 2 Liter) entstand nach der zweiten Erntezentrifugation, bei welcher die dünnflüssige, homogene Lösung von *Ignicoccus*-Zellen, resultierend aus der ersten Erntezentrifugation, über einen weiteren Zentrifugationsschritt in einer mitteltourigen Zentrifuge (Jouan-Zentrifuge KR422, Jouan GmbH, Fernwald) aufkonzentriert wurde. Das Ergebnis dieser Zentrifugation war ein dickflüssiges Zellpellet von *I. hospitalis*-Zellen und ein trüber Überstand (Überstand 2), welcher in den meisten Fällen zur Isolation von Zellanhängen herangezogen wurde (Übersichtsschema Fermenterernte und entstehende Fraktionen siehe Meyer, 2007). Die Kultivierung und Ernte wurde im Regelfall von Ulf Küper oder Thomas Heimerl durchgeführt.

5.1 Isolation von Zellanhängen aus dem Fermentationsüberstand

<u>MES-Puffer</u>	MES	10 mM
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 mM
	DTT	1 mM
	pH 6,0 – mit 1N NaOH einstellen	

Um Zellanhänge von *I. hospitalis* anreichern zu können wurde Überstand 2 mit 10,5 % (w/v) PEG 6000 und 5,8 % (w/v) NaCl versetzt und die Suspension nach dem Lösen der Salze über Nacht bei 4 °C gelagert. Das auf diese Weise entstandene Präzipitat wurde für 1 h bei 16.000 Upm (JLA 16.250-Rotor, 4 °C, Beckman Avanti® J-26 XP, Beckman Coulter, Fullerton, USA) abzentrifugiert und in einem kleinen Volumen MES-Puffer aufgenommen.

5.2 Dichtegradienten-Zentrifugation

Um eine bessere Auftrennung der angereicherten Zellanhänge zu erzielen wurden sie einer isopyknischen Zentrifugation mit Cäsiumchlorid unterzogen. Zu diesem Zweck wurde das in MES-Puffer resuspendierte Präzipitat mit 0,55 g/ml CsCl versetzt und bis zum Lösen des Salzes resuspendiert, bevor die Suspension in Ultrazentrifugationsröhrchen (UZ-Röhrchen, Beckman Ultra-Clear 3½ Zoll Zentrifugenröhrchen; Beckman Coulter, Unterschleißheim) überführt wurde. Im Anschluss erfolgte eine Ultrazentrifugation für mindestens 48 h bei 48.000 Upm (SW 60 Rotor, 4 °C, Beckman Optima™ LE 80 K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter, Unterschleißheim), bei der sich die Proteine ihrer Schwebedichte entsprechend auftrennten und in Form von unterschiedlichen Fraktionen voneinander abgrenzten.

5.3 Isolation und Dialyse der Fraktionen

<u>MES-Dialysepuffer</u>	MES	5 mM
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 mM
	DTT	0,1 mM
	pH 6,0 – mit 1N NaOH einstellen	

Nach der Ultrazentrifugation wurden die UZ-Röhrchen vorsichtig in eine Halterungsvorrichtung (Eigenbau der Biologie-Werkstatt der Universität Regensburg) gespannt und fotodokumentiert. Die entstandenen Fraktionen wurden durch seitliches Punktieren der UZ-

Röhrchen mit einer 1 ml Einmalspritze abgezogen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Um das Cäsiumchlorid aus den Proben zu entfernen wurden sie bei 4 °C dreimal für je eine Stunde gegen MES-Dialysepuffer dialysiert. Zu diesem Zweck wurden bereits im Vorfeld Dialyseschläuche (Visking®, mwco 12.000-14.000, Serva Electrophoresis GmbH) in ca. 30 cm große Stücke geschnitten und für 15 Min. in einer Lösung aus 100 mM NaHCO₃ und 1mM EDTA gekocht, bevor sie nach einem weiteren Auskochschritt von 15 Min. in H₂O_{millipore} in 70 % (v/v in H₂O_{millipore}) EtOH aufbewahrt werden konnten. Nach Beendigung der Dialyse wurden sämtliche Fraktionen elektronenmikroskopisch, über die Analyse von Suspensionspräparaten (s. Kap. II.13.1), und proteinbiochemisch, über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (s. Kap. II.6.2), auf ihren Reinheitsgrad untersucht. Je nach Verwendungszweck konnten stark mit anderen Proteinen verunreinigte Fraktionen, in denen Zellanhänge in der gewünschten Konzentration vorhanden waren, über einen oder mehrere Ultrazentrifugations- bzw. Dialyseschritte unter analogen Bedingungen (s. Kap. II.5.2) weiter aufgereinigt werden.

6 Proteinbiochemische Methoden

6.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung fand nach einer abgewandelten Methode zur Proteinbestimmung nach Bradford (1976) statt.

Dabei wurde im ersten Schritt eine Eichgerade mit BSA-Lösungen folgender Konzentrationen erstellt: 0,0 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,3 mg/ml; 0,6 mg/ml; 1,2 mg/ml; 2,4 mg/ml. Je 10 µl der BSA-Lösungen wurden mit 990 µl eines 1:5 in H₂O_{millipore} verdünnten und abfiltrierten Coomassie-Reagenz (Roti®-Quant, Roth, Karlsruhe) vermischt und für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Analog wurde mit 10 µl der zu messenden Proben verfahren. Im Anschluss wurde die Adsorption aller Proben bei 450 nm und 590 nm gegen H₂O_{millipore} als Referenz gemessen (U 2000 Spectrophotometer, Hitachi, Krefeld) und der Quotient A_{590}/A_{450} berechnet. Von diesem Quotienten wurde der Wert, der sich bei der Messung mit der 0,0 mg/ml BSA-Lösung ergab, subtrahiert, und dieser Wert als corr. A_{590}/A_{450} bezeichnet. Die eingesetzten BSA-Mengen wurden durch den zugehörigen corr. A_{590}/A_{450} -Wert dividiert und aus den daraus resultierenden Ergebnissen der Mittelwert gebildet. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Probe wurde der zugehörige corr. A_{590}/A_{450} -Wert mit dem zuvor errechneten Mittelwert multipliziert und das Ergebnis durch 10 geteilt. Der daraus resultierende Wert entsprach somit der Proteinkonzentration der Probe in µg/µl.

6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Alle für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) benötigten Puffer und Lösungen beruhen auf Rezepten von Lämmli (1970), modifiziert von Schägger und von Jagow (1987).

6.2.1 Herstellung der Gele

<u>Sammelgelpuffer</u>	Tris/HCl pH 6,8	0,5 M
<u>Trenngelpuffer</u>	Tris/HCl pH 8,8	1,5 M

Zur Herstellung von Minigelen wurde zunächst das meist 10%ige Trenngel luftblasenfrei zwischen die vorbereiteten Gelplatten gegossen und mit 2-Propanol überschichtet. Nach 30minütiger Polymerisationszeit wurde das 2-Propanol abgezogen und ein 4%iges Sammelgel aufgebracht, in welches ein Kunststoffkamm gesteckt wurde. Nach weiteren 15 Min. Polymerisation konnte das SDS-Gel für die Gelelektrophorese verwendet werden.

Substanz	4 % Sammelgel	10 % Trenngel
Sammel-/Trenngelpuffer	0,5 ml	1,5 ml
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)	0,3 ml	2,0 ml
H ₂ O _{millipore}	1,2 ml	2,5 ml
APS, 10 % (w/v in H ₂ O _{millipore})	15 µl	30 µl
TEMED	3 µl	5 µl

6.2.2 Probenvorbereitung

<u>5 x Probenpuffer</u>	Tris/HCl pH 7,5	625 mM
	Glycerin	50 % (v/v)
	SDS	12,5 % (w/v)
	β-Mercaptoethanol	12,5 % (v/v)
	BPB	0,05 % (w/v)
	pH 7,5 – mit 1N HCl einstellen	

Alle Proben wurden im Vorfeld der elektrophoretischen Auftrennung mit einem entsprechenden Volumen des 5 x Probenpuffers versetzt und für 10 Min. bei 95°C in einem zirkulierenden Wasserbad (Thermoinkubator, Haake DC3, Haake, Karlsruhe) denaturiert.

6.2.3 Elektrophoresebedingungen

<u>Laufpuffer – Kathode</u>	Tris/HCl pH 8,3	100 mM
	Tricin	100 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
<u>Laufpuffer – Anode</u>	Tris/HCl pH 8,8	200 mM

Für die Gelelektrophorese standen eigens konstruierte Elektrophoreseapparaturen (Eigenbau der Biologie-Werkstatt der Universität Regensburg) sowie eine IBI-Powersupply (MBP 3000 EP, IBI Powersupplies, Kodak Int. Biotech. New Haven, USA) zur Verfügung. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für ca. 15 Min. bei 15 mA in einem diskontinuierlichen Tris-Tricin-Laufpuffer-System nach Schägger und von Jagow (1987), um die Proben im Sammelgel zu konzentrieren. Bei Erreichen des Trenngels wurde die Stromstärke auf 30 mA erhöht und der Lauf beendet, nachdem die Bromphenolblau-Bande die untere Gelkante erreichte.

6.2.4 Färbung von SDS-Gelen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden die SDS-Gele mit einer der nachfolgenden Methoden gefärbt. Dabei wurden alle Schritte unter Schütteln bei Raumtemperatur durchgeführt.

Coomassie-Färbung (nach Schägger und von Jagow, 1987)

Schritt	Substanz	Konzentration	Dauer
Fixierung	Methanol	50 % (v/v)	30 Min.
	Essigsäure	10 % (v/v)	
Färbung	Coomassie G 250	0,025 % (w/v)	30 Min.
	Essigsäure	50 % (v/v)	
Entfärbung	Ethanol	30 % (v/v)	bis Banden sichtbar
	Essigsäure	10 % (v/v)	

Zur Detektion der Proteine wurde routinemäßig die Coomassie-Färbung eingesetzt, mit welcher ca. 400 ng Protein pro cm² nachgewiesen werden können.

Silberfärbung (nach Blum *et al.*, 1987)

Schritt	Substanz	Konzentration	Dauer
Fixierung	Methanol	50 % (v/v)	30 Min.
	Essigsäure	10 % (v/v)	
Waschen I	Ethanol	50 % (v/v)	10 Min.
Waschen II	Ethanol	10 % (v/v)	10 Min.
Blockieren	Natriumthiosulfat	0,02 % (w/v)	1 Min.
Waschen	H ₂ O _{millipore}		3 x 20 Sek.
Färbung	Silbernitrat	0,1 % (w/v)	20 Min.
	Formaldehyd	0,027 % (v/v)	
Waschen	H ₂ O _{millipore}		2 x 20 Sek.
Entwicklung	Natriumcarbonat	6 % (w/v)	bis Banden sichtbar
	Formaldehyd	0,018 % (v/v)	
Stoppen	Essigsäure	10 % (v/v)	15 Min.

Aufgrund der hohen Sensitivität der Silberfärbung, mit der Proteine bereits ab 10 ng pro cm² detektiert werden können, wurde diese Methode bevorzugt für Proben eingesetzt, die eine niedrige Proteinkonzentration aufwiesen bzw. nur in geringer Menge vorhanden waren.

Alternativ konnten bereits Coomassie-gefärbte Gele nach vollständiger Entfärbung einer nachträglichen Silberfärbung unterzogen werden.

6.2.5 Dokumentation

<u>Geltrocknungslösung</u>	Ethanol	22 % (v/v)
	Glycerin	2 % (v/v)
	2-Propanol	1 % (v/v)
	pH 5 (ergibt sich)	

Neben einer Fotodokumentation (Kamera: Sony Cybershot, DSC-S75) wurden alle Gele mit Hilfe des Dry Ease Geltrocknungssystems konserviert. Zu diesem Zweck wurden die gefärbten Gele bei Raumtemperatur für 30 Min. in Geltrocknungslösung geschwenkt, bevor sie in einem speziellen Rahmen zwischen zwei Cellophanfolien (Dry Ease™ Minicellophane, Invitrogen, Karlsruhe) gespannt und über Nacht getrocknet wurden.

6.3 Western Blot

6.3.1 Transfer der Proteine auf PVDF-Membran

<u>Transferpuffer (SemiDry)</u>	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 % (v/v)
	pH 8,3 (ergibt sich)	

Nach erfolgter Auftrennung der Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das SDS-Gel sowie sechs Whatmanpapiere (Whatman® Chromatography Paper, 3 mm, Whatman, England) für 10 Min. bei Raumtemperatur in Transferpuffer geschwenkt. Analog wurde mit einer PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore, Eschborn) verfahren, welche vor der zehnmütigen Inkubation in Transferpuffer für 2-5 Min. in Methanol p. a. aktiviert wurde. Für den Transfer der Proteine auf die Membran wurde die SemiDry Elektroblot Methode verwendet, bei welcher im ersten Schritt die Whatmanpapiere, das SDS-Gel und die PVDF-Membran nach Herstellerangaben in eine entsprechende Transferapparatur (Trans-Blot® SD SemiDry Transfer Cell, Biorad, München) geschichtet wurden. Die Proteine wurden darin für 1 Stunde bei einer konstanten Spannung von 22 V auf die Membran übertragen. Im

Anschluss konnten die Proteine entweder mit Coomassie angefärbt oder mit Hilfe von adäquaten Antikörpern immunmarkiert werden.

6.3.2 Detektion der Proteine über Coomassie-Färbung

Um Proteine über eine N-terminale Sequenzierung nach Edman (Allen, 1989) identifizieren zu können, mussten diese nach Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran mit Coomassie angefärbt werden. Zu diesem Zweck wurde die PVDF-Membran getrocknet und für ca. 5 Min. in Coomassie-Färbelösung (s. Kap. II.6.2.4) inkubiert. Eine Entfärbung fand in 30 % (v/v) Ethanol bis zum Erscheinen der Banden statt.

6.3.3 Detektion der Proteine über immunologischen Nachweis

<u>TBS-(T) Puffer</u>	Tris/HCl pH 7,6	20 mM
	NaCl	137 mM
	(Tween 20	0,1 % (v/v))
<u>Anfärbepuffer</u>	Tris/HCl pH 8,8	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5 mM

Nach erfolgtem Elektrotransfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde die Membran im Falle von in Kaninchen generierten, primären Antikörpern für 10 Min. in TBS-T Puffer geschwenkt. Freie Bindungsstellen wurden über Nacht durch Inkubation in TBS-T Puffer plus 5 % (w/v) Magermilchpulver bei 4 °C blockiert. Im Anschluss wurde die Membran für 10 Min. mit TBS-T Puffer gewaschen, bevor eine einstündige Inkubation mit dem primären Antikörper (verdünnt in TBS-T Puffer plus 3 % (w/v) Magermilchpulver) in der gewünschten Verdünnung erfolgte. Nach viermaligem Waschen in TBS-T Puffer für 10 Min. erfolgte eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Als sekundäre Antikörper wurden standardmäßig goat anti-rabbit IgGs, gekoppelt an alkalische Phosphatase, verwendet, welche in TBS-T Puffer plus 1 % (w/v) Magermilchpulver verdünnt wurden. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 Min. mit TBS-T Puffer sowie zweimal, für die gleiche Zeitspanne, in TBS Puffer gewaschen. Die Detektion des sekundären Antikörpers erfolgte in 10 ml Anfärbepuffer, welchem 80 µl NBT/BCIP Stock Solution (Roche, Mannheim) zugegeben wurde. Dabei wurde die Membran ohne Schwenken bis zum Erscheinen der Proteinbanden in dieser Lösung inkubiert. Ein Reaktionsstopp erfolgte durch Inkubation der Membran für 15 Min. in

H₂O_{millipore}. Alle oben beschriebenen Schritte erfolgten, soweit nicht anders erwähnt, unter Schütteln bei Raumtemperatur.

Im Falle einer Immunmarkierung mit dem mouse anti-His Antikörper wurde PBS-(T)-Puffer (s. Kap. II.6.4.2, PBS-T: PBS + 0,1% (w/v) Tween 20) anstatt von TBS-(T) Puffer verwendet. Als sekundärer Antikörper wurden anti-mouse IgGs, gekoppelt an Meerrettich Peroxidase (Sigma, Taufkirchen) verwendet. Alle Inkubationen, mit Ausnahme der Detektionsschritte, wurden in der gleichen Reihenfolge und Dauer wie oben beschrieben durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Western Lightning Chemoluminescence Reagent (Perkin Elmer), bei welchem Luminol- und Oxidations-Reagenz vor der Verwendung im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Nach einminütiger Inkubation der Membran in dieser Lösung wurde die Membran luftblasenfrei in eine Klarsichtfolie gelegt und in eine Filmkassette transferiert. Im Anschluss wurde in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm aufgelegt und dieser für Zeiträume von 30 Min. bis zu 10 h exponiert. Der Film wurde daraufhin solange in Eukobrom-Entwickler inkubiert bis die gewünschte Signalstärke auftrat. Nach einem kurzen Waschschrift in Wasser wurde der Film für 15 Min. mit Acido Fixierer fixiert und abschließend über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Alternativ konnten die Blots mit Hilfe des CCD-Imagingsystems Fusion FX7 (Vilber Lourmat, Eberhardzell) nach Herstellerangaben entwickelt werden.

6.4 Co-Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Co-Immunpräzipitation (IP) sollten weitere, am Aufbau des Fiberankers beteiligte Proteine identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde eine Proteinlösung aus lysierten *I. hospitalis*-Zellen mit Sepharose Beads und polyklonalen Antikörpern, die gegen das dominierende Fiberprotein Iho670 gerichtet waren, versetzt. Dabei kann der spezifische Iho670-Antikörper an sein Zielepitop binden und durch eine Kopplung an Sepharose Beads in Verbindung mit möglichen Interaktionspartnern abzentrifugiert werden. Eine Detektion dieser Interaktionspartner ist im Anschluss z. B. über SDS-PAGE möglich.

6.4.1 Zellaufschluss

<u>Lyse-Puffer</u>	Tris/HCl pH 7,6	25 mM
	NaCl	150 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
	Triton X-100	1 % (v/v)

Um Teile von Ankerstrukturen bzw. unbekannte Proteinbestandteile der Fibers zu erhalten wurden 0,5 g gefrorene *I. hospitalis*-Zellen mit 3,5 ml Lyse-Puffer resuspendiert. Als Proteasehemmer wurde dem Lyse-Puffer im Vorfeld 0,1 mM frisches PMSF (gelöst in EtOH) zugegeben. Die Zellsuspension wurde gleichmäßig auf 1,5 ml Eppendorfcups verteilt und für 2 Stunden in einem Rollerdrum (Eigenbau der Biologie-Werkstatt der Universität Regensburg) bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert, um den Grad des Zellaufschlusses zu überprüfen. Die Suspension wurde für 10 Min. bei 13.000 Upm in einer Tischzentrifuge (5417C, Eppendorf AG, Hamburg) abzentrifugiert, wobei größere Zellfragmente pelletiert werden konnten. Nach Vereinigung der Überstände wurde die Proteinkonzentration wie in Kap. II.6.1 beschrieben bestimmt, per Western Blot (s. Kap. II.6.3) die Existenz des Iho670-Proteins in der Überstandsfraction nachgewiesen und diese Fraktion bis zur Durchführung der Co-IP bei 4 °C gelagert.

6.4.2 Vorbereitung der Sepharose Beads

<u>PBS-Puffer</u>	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	1,76 mM
	pH 7,4 – mit 1N HCl einstellen	

Im Vorfeld der Co-Immunpräzipitation war es notwendig die Sepharose Beads vorzubereiten. Dabei ist die Wahl der Sepharose Beads abhängig von der Herkunft des verwendeten Antikörpers. So binden Protein G Sepharose Beads bevorzugt an Maus-IgGs. Protein A Sepharose Beads werden im Gegensatz dazu in der Regel bei Antikörpern verwendet, die in einem Kaninchen generiert wurden (Harlow und Lane, 1988), was auch bei den Antikörpern gegen Iho670 der Fall war.

Im ersten Schritt wurden Protein A Sepharose Beads in einem 10fachen Volumen H₂O_{millipore} für 2 Stunden unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur gequollen. Im Anschluss wurden die Beads für 5 Min. bei 3000 Upm in einer Tischzentrifuge (5417C, Eppendorf AG, Hamburg) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Beads zweimal mit 1 ml PBS-Puffer, unter analogen Zentrifugationsschritten, gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Sepharose Beads 1:1 (v:v) mit Lyse-Puffer versetzt und waren somit für einen Einsatz in eine Co-IP bereit.

6.4.3 Durchführung der Co-Immunpräzipitation

Für die eigentliche Co-Immunpräzipitation wurden 200 µg des Zelllysates (Input) mit 5 µl des rabbit anti-Iho670 Antikörpers versetzt und die Probe mit Lyse-Puffer auf 400 µl aufgefüllt. Zur Kontrolle wurde ein identischer Ansatz, dem keine Antikörper zugegeben wurden, mitgeführt. Eine weitere Kontrolle stellte ein Ansatz, in welchem 5 µl Antikörper mit Lyse-Puffer auf 400 µl aufgefüllt wurden, dar, um zu ermitteln welche Signale in den nachfolgenden Western Blots bzw. SDS-PAGEs von den Beads bzw. dem Antikörper stammten. Alle Ansätze wurden im Anschluss für 2 Stunden in einem Rollerdrum (Eigenbau der Biologie-Werkstatt der Universität Regensburg) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden alle Ansätze mit 40 µl Beads-Suspension (s. Kap. II.6.4.2) versetzt und bei Raumtemperatur für weitere 2 Stunden im Rollerdrum gedreht. Im nächsten Schritt wurden die Ansätze für 5 Min. bei 3000 Upm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (5417C, Eppendorf AG, Hamburg), der Überstand (ÜS A) abgenommen und die Beads dreimalig mit 0,5 ml Lyse-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der verbleibende Überstand verworfen und die Beads mit 30 µl 2,5 x Probenpuffer für 10 Min. bei 95°C aufgeköcht. Analog wurde mit den abgenommenen Überstandsfraktionen (ÜS A, je 30 µl) sowie einer Input-Probe verfahren, die ebenfalls zu Kontrollzwecken untersucht werden sollte. Nach der SDS-Gelelektrophorese wurde das Gel entweder auf eine PVDF-Membran geblottet und immunmarkiert (s. Kap. II.6.3), oder die Proteine mit Hilfe einer modifizierten Silberfärbung, im Vorfeld der Sequenzierung über ESI Nano-LC MS/MS, angefärbt.

6.4.4 Modifizierte Silberfärbung im Vorfeld einer ESI Nano-LC MS/MS

Schritt	Substanz	Konzentration	Dauer
Fixierung	Ethanol	40 % (v/v)	1 Std.
	Essigsäure	10 % (v/v)	
Waschen I+II	Ethanol	30 % (v/v)	2 x 20 Min.
Waschen III	H ₂ O _{millipore}		20 Min.
Blockieren	Natriumthiosulfat	0,02 % (w/v)	1 Min.
Waschen	H ₂ O _{millipore}		3 x 20 Sek.
Färbung	Silbernitrat	0,1 % (w/v)	20 Min.
Waschen	H ₂ O _{millipore}		2 x 20 Sek.
Entwicklung	Natriumcarbonat	3 % (w/v)	bis Banden sichtbar
	Formaldehyd	0,05 % (v/v)	
Stoppen	EDTA	0,05 M	15 Min.

Alle hier aufgeführten Schritte wurden unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur ausgeführt. Die einzige Ausnahme bildete der Färbungsschritt, welcher mit einer auf 4°C abgekühlten Lösung bei 4°C durchgeführt wurde. Des Weiteren war darauf zu achten, dass sich das Gel beim Entwicklungsschritt in einem Glasgefäß befand.

6.5 Proteinsequenzierung

6.5.1 N-terminale Sequenzierung

Um Proteine über eine N-terminale Sequenzierung nach Edman (Allen, 1989) analysieren zu können, mussten diese nach erfolgtem Western Blot und einer Coomassie-Färbung (s. Kap. II.6.3) mit einem Einmalskalpell ausgeschnitten und über Nacht in H₂O_{millipore} gewaschen werden. Der Edman-Abbau erfolgte daraufhin im Labor von Prof. Dr. R. Deutzmann am Lehrstuhl für Biochemie, Universität Regensburg.

6.5.2 In-Gel-Verdau und MALDI-TOF MS/MS

Im Vorfeld der Proteinsequenzierung über MALDI-TOF (*Matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight*) Tandem-MS (Tandem-Massenspektrometrie, kurz MS/MS) (Tanaka *et al.*, 1988) wurden die Proteine über eine SDS-Gelelektrophorese

aufgetrennt und einer Coomassie-Färbung unterzogen (s. Kap. II.6.2), wobei zum Entfärben des Gels 7%ige (v/v) Essigsäure verwendet wurde. Um Pufferreste zu entfernen wurde das Gel über Nacht in $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$ geschwenkt. Die betreffenden Gelbanden wurden mit Hilfe eines Einmalskalpells ausgeschnitten und nach Bestimmung des Volumens in 1 mm^3 große Würfel zerlegt. Nach Überführen der Gelwürfel in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden diese unter Schütteln für je 30 Min. in 200 μl der folgenden Lösungen gewaschen: (1) 50 mM NH_4HCO_3 , (2) 50 mM NH_4HCO_3 / 25 % (v/v) Acetonitril, (3) 25 % (v/v) Acetonitril, (4) 50% (v/v) Acetonitril.

Nach jedem Waschschrift wurde die jeweilige Lösung abgezogen und verworfen. Nach Abnahme der letzten Lösung wurden die Gelwürfel für etwa eine Stunde bis zur Trockne lyophilisiert (Univapo 150H und Unijet II, Uniequip Laborgerätebau, Martinsried) und in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, in welchen der proteolytische Verdau mit 2 μg Trypsin (Roche, Mannheim) pro 100 μl ursprünglichem Gelvolumen stattfand. Dabei war darauf zu achten, dass der eingesetzte Puffer (50 mM NH_4HCO_3) das 1,5fache des Gelvolumens betrug und dieser in zwei gleichgroßen Portionen zugegeben wurde, bei welcher die erste Portion die komplette Enzymmenge enthielt. Der Verdau wurde über Nacht bei 37°C unter sanftem Schütteln durchgeführt. Im Anschluss wurde der Überstand des Verdaus verworfen und die Peptide durch einstündige Inkubation in folgenden Lösungen extrahiert: (1) 30 μl 100 mM NH_4HCO_3 , (2) 30 μl 100 mM NH_4HCO_3 , (3) 30 μl 100 mM NH_4HCO_3 in 50 % (v/v) Acetonitril.

Die aus diesen Schritten resultierenden Überstände wurden vereinigt und am Lehrstuhl Biochemie der Universität Regensburg (Prof. Dr. R. Deutzmann) analysiert, wo die massenspektrometrische Untersuchung von Eduard Hochmuth an einem 4700 Proteomics Analyzer - MALDI MS/MS-Gerät (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt und mit Hilfe der Software Mascot (Matrix Science Ltd., London; Perkins *et al.*, 1999) ausgewertet wurde.

6.5.3 Proteinsequenzierung mit ESI Nano-LC MS/MS

Eine Proteinsequenzierung über ESI (*Electron spray ionization*, Fenn *et al.*, 1989) Nano-LC (*liquid chromatography*) MS/MS wurde bei Proteinbanden, die mit Hilfe einer Co-Immunpräzipitation identifiziert wurden, durchgeführt. Dabei bietet die anfängliche chromatographische Trennung mit online-gekoppelter ESI Nano-MS/MS von Peptidgemischen eine sehr sensitive Analysemöglichkeit im Hinblick auf eine Proteinidentifizierung. So können meist genauere und eindeutige Proteinidentifikationen mit höheren Score-Werten bei einer Datenbanksuche erzielt werden, als im Falle einer Sequenzierung über MALDI-TOF MS/MS.

Analysiert wurden Proteinbanden, welche aus silbergefärbten SDS-Gelen mit Hilfe eines Einmalskalpelles ausgeschnitten wurden. Dabei war darauf zu achten eine Silberfärbungsmethode (s. Kap. II.6.4.4) zu verwenden, die weitestgehend auf einen Einsatz von Aldehyden verzichtet, um eine irreversible Vernetzung bzw. Modifikation der Proteine zu verhindern. Die silbergefärbten Proteinbanden wurden in 1 ml Eppendorfcups transferiert und von Dr. Jörg Reinders am Institut für funktionelle Genomik der Universität Regensburg über ESI Nano-LC MS/MS analysiert. Für eine zugehörige Datenbanksuche wurde die NCBI Proteindatenbank (Version: September 2009) verwendet.

6.6 Bioinformatische Auswertung von Proteinsequenzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Datenbanken und Algorithmen zur Auswertung von Proteinsequenzen verwendet. Die dabei benutzten Programme sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Anwendung/Version	Literatur
KEGG	http://www.genome.jp/kegg/
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
ClustalW2	Oliver <i>et al.</i> , 2005
FlaFind 1.0	Szabó <i>et al.</i> , 2007
MaxSubSeq	Fariselli <i>et al.</i> , 2003
MINNOU	Cao <i>et al.</i> , 2006
Phobius	Käll <i>et al.</i> , 2004
PSORTb	Yu <i>et al.</i> , 2010
SOSUI	Hirokawa, 1998
TMHMM 2.0	Krogh <i>et al.</i> , 2001
TMpred	Hofmann u. Stoffel, 1993

7 Molekulargenetische Methoden

7.1 DNA-Isolation

<u>Puffer A</u>	Tris/HCl pH 8,0	500 mM
	NaCl	100 mM
	Na ₃ Citrat	1 mM
<u>Puffer B</u>	Tris/HCl pH 8,0	200 mM
	NaCl	100 mM
	SDS	4 % (w/v)
<u>CTAB/NaCl-Lösung</u>	5 M NaCl-Lösung	140 µl
	CTAB	100 mg
	H ₂ O _{millipore}	ad 1000 µl
	pH (ergibt sich)	

Die Isolation der genomischen DNA aus *I. hospitalis*-Zellen wurde nach einem modifizierten Protokoll von Muscholl *et al.* (1993) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 80 ml einer gut bewachsenen Kultur von *I. hospitalis* für 30 Min. bei 13.000 Upm (JA 25.50-Rotor, 4°C, Beckman Avanti® J-26 XP, Beckman Coulter, Fullerton, USA) abzentrifugiert, das Pellet in 400 µl Puffer A resuspendiert und die Suspension in ein steriles 2 ml Eppendorfcup transferiert. Nach Zugabe von 400 µl Puffer B sowie 1 mg Proteinase K wurde der Ansatz für eine Stunde in einem zirkulierenden Wasserbad (Thermoinkubator, Haake DC3, Haake, Karlsruhe) bei 65°C inkubiert. Der Zellaufschluss wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und der Ansatz, falls nötig, noch dreimal bei -80°C eingefroren und bei 65°C im Wasserbad aufgetaut. Eine 60minütige Inkubation mit 0,2 mg/ml RNase A bei 37°C entfernte störende RNA-Moleküle aus der Lösung, bevor Proteine und Histone durch Zugabe von 130 µl einer 5 M NaCl-Lösung und mehrmaligem Invertieren des Eppendorfcups von der DNA entfernt wurden. Im nächsten Schritt wurden 100 µl CTAB/NaCl-Lösung zugegeben, der Ansatz mehrmals invertiert und für 10 Min. bei 65°C inkubiert, was einer Komplexierung der Proteine diente. Um die Proteine daraufhin abzutrennen, wurde das Zelllysate mit 1 Vol. wasserfreiem Phenol ausgeschüttelt und für 10 Min. bei 13.000 Upm in einer Tischzentrifuge (4°C, Himac CT15RE, Hitachi Koki Co., Ltd, Japan) zentrifugiert, wonach die wässrige Phase abgenommen werden konnte. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt bis keine Interphase mehr auftrat. Im Anschluss wurde die wässrige Phase abgenommen und mit 1 Vol.

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1), bzw. im nächsten Schritt mit 1 Vol. Chloroform:Isoamylalkohol (24:1), unter analogen Zentrifugationsbedingungen ausgeschüttelt. Der wässrige Überstand wurde abgenommen und in ein separates Eppendorfcup überführt, worin die DNA durch Zugabe von 0,6 Vol. eiskaltem Isopropanol für mindestens 30 Min. bei -20 °C gefällt wurde. Die DNA wurde durch eine Zentrifugation bei 13.000 Upm bei 4 °C für 20 Min. pelletiert (Himac CT15RE, Hitachi Koki Co., Ltd, Japan) und daraufhin zweimal mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung bei Raumtemperatur über Nacht im Abzug konnte die DNA in einem gewünschten Volumen H₂O_{millipore} aufgenommen werden. Wurde die DNA nicht unmittelbar benötigt, erfolgte eine Lagerung bei -20 °C.

7.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde photometrisch an einem U 2000 Spectrophotometer (Hitachi, Krefeld) bei Licht einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die zu messenden DNA-Lösung 1:20 (v/v) mit H₂O_{millipore} verdünnt (Gesamtvolumen 100 µl) und in einer Quarzküvette (Hellma 105.202-QS, Schichtdicke 10 mm, Zentrum 10 mm, Hellma GmbH & Co. KG, Mülldorf) gegen H₂O_{millipore} als Referenz gemessen. Eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei einer Wellenlänge von 260 nm sowie einem Strahlengang von 10 mm entspricht dabei einer Konzentration von 0,05 µg/µl doppelsträngiger DNA. Die Konzentration der DNA in Lösung konnte daher nach folgender Formel berechnet werden:

$$c[\text{DNA}] = \text{OD}_{260} \times 20 \times 0,05 \text{ µg/µl}$$

Sollte der Reinheitsgrad von genomischen DNA-Lösungen bestimmt werden, wurde ein Nanoliter-Spektralphotometer (NanoDrop ND-1000, Peqlab, Erlangen) für die Messung verwendet. Zu diesem Zweck wurde 1 µl der DNA-Lösung gegen 1 µl H₂O_{millipore} als Referenz gemessen. Das Gerät misst dabei die Adsorption der Lösung in einem Bereich von 220 nm bis 350 nm und berechnet daraus sowohl die DNA-Konzentration, als auch den Quotienten A_{260}/A_{280} , welcher die Reinheit der DNA-Präparation beschreibt. Liegt dieser Quotient bei einem Wert zwischen 1,8 und 2,0 wurde die genomische DNA-Präparation für Versuche verwendet. Andernfalls wurde die unter Kap. II.7.1 beschriebene Extraktion wiederholt.

7.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Sämtliche Polymerase-Kettenreaktionen (Saiki *et al.*, 1988) wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) in einem Thermocycler (MyCycler™, Thermal Cycler, Biorad, München) durchgeführt. Dabei wurden standardmäßig 20 µl Reaktionsansätze nach folgendem Schema pipettiert:

Substanz	Volumen	Endkonzentration
5x Phusion HF Reaktionspuffer	4 µl	1 x
dNTPs (je 10 mM)	0,4 µl	je Nukleotid 200 µM
Vorwärtsprimer (10 mM)	2 µl	1 µM
Rückwärtsprimer (10 mM)	2 µl	1 µM
DNA-Template	x µl	5-100 ng
Phusion DNA Polymerase (20 U/µl)	0,2 µl	0,02 U/µl
H ₂ O _{millipore}	ad to 20 µl	

Im Anschluss wurde die PCR nach folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	98 °C	30 Sek.	1
Denaturierung	98 °C	10 Sek.	34
Annealing	68 °C	30 Sek.	
Elongation	72 °C	30 Sek.	
Finale Elongation	72 °C	5 Min.	1
Kühlung	4 °C	∞	1

7.4 Agarose-Gelelektrophorese

<u>TAE-Puffer</u>	Tris/Acetat pH 8,0	10 mM
	EDTA	0,1 mM

<u>10 x Gelauftragspuffer</u>	BPB	0,25 % (w/v)
	Xylencyanol	0,25 % (w/v)
	Glycerin	50 % (v/v)
	EDTA	20 mM
	pH 8,0 (ergibt sich)	

Zur Auftrennung von Nukleinsäuregemischen wurden standardmäßig 1%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Zur Herstellung der Gele wurde die entsprechende Agarosemenge abgewogen und in 1 x TAE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurde der Lösung Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,4 µg/µl zugegeben, der Ansatz durch Schwenken vermischt und alles luftblasenfrei in eine Gelapparatur (Horizon® 58, GibcoBRL, Gaithersburg) mit entsprechendem Gelkamm gegossen. Nach Aushärtung des Gels erfolgte eine Überschichtung mit 1 x TAE-Puffer, der gleichzeitig als Laufpuffer diente. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 10 x Gelauftragspuffer (1 + 9, v/v) vermischt und nach Entfernen des Gelkamms vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung an einer Biometra-Powersupply (Biometra Standard Power Pack P25; Biometra, Göttingen) erfolgte bei 120 V (für ca. 30 Min.) für kleine Gele bzw. bei 150 V (für ca. 90 Min.) für präparative Agarosegele. Durch Verwendung von Ethidiumbromid als interkalierendes Agens konnte die DNA auf einem UV-Leuchtschirm detektiert und dokumentiert werden sowie durch einen Vergleich mit Markerfragmenten bekannter Größe auf ihre Größe hin abgeschätzt werden.

7.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um Nukleotide, nicht inkoperierte Primer sowie die DNA-Polymerase nach erfolgter PCR zu entfernen, wurden die PCR-Produkte nach einer Agarosegelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und über einen Gelextraktionskit (E.Z.N.A.TM Gel Extraction Kit, Omega Bio-Tek) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

7.6 Aufreinigung von Plasmiden

7.6.1 Plasmid-DNA-Minipräparation aus *E. coli*

<u>GTE-Puffer</u>	Glucose	50 mM
	Tris/HCl pH 8,0	25 mM
	EDTA pH 8,0	10 mM
<u>Alkali-SDS-Lösung</u>	NaOH	0,2 N
	SDS	1 % (w/v)
<u>Acetat-Lösung</u>	Kaliumacetat	5 M
	pH 4,8 – mit 5 M Eisessig einstellen	

Eine Plasmidaufreinigung in Form einer Plasmid-DNA-Minipräparation wurde beispielsweise bei zu testenden Transformanten aus Klonierungsexperimenten eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden die Bakterien über Nacht in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37°C unter Schütteln bei 250 Upm (Unitron, Infors AG, Bottmingen) angezogen. Nach erfolgreichem Wachstum wurden 1,5 ml der Bakterienkultur steril entnommen und der Ansatz bei Raumtemperatur für 20 Sek. bei 13.000 Upm in der Tischzentrifuge (5417C, Eppendorf AG, Hamburg) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Bakterien in 100 µl GTE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1 µl RNase A (Stammlösung: 1 µg/µl) inkubierte der Ansatz für 5 Min. bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden 200 µl frische Alkali-SDS-Lösung zugegeben, der Ansatz durch mehrmaliges Invertieren vermischt und für 5 Min. auf Eis inkubiert. Nach einer dreiminütigen Zentrifugation bei 13.000 Upm (RT; 5417C, Eppendorf AG, Hamburg) wurde der Überstand abgenommen und erneut unter analogen Bedingungen zentrifugiert. Zum verbleibenden Überstand wurde 900 µl eiskaltes Ethanol gegeben und der Ansatz mehrfach invertiert. Im folgenden Schritt wurde die Plasmid-DNA durch eine 15minütige Inkubation auf Eis gefällt und für 30 Min. bei 14.000 Upm abzentrifugiert (4°C, Himac CT15RE, Hitachi Koki Co., Ltd, Japan). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 900 µl eiskaltem 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen (Zentrifugation: 5 Min. bei 14.000 Upm, 4°C, Himac CT15RE, Hitachi Koki Co., Ltd, Japan). Nach Abnahme des verbleibenden Überstandes konnte das Pellet luftgetrocknet und in 35 µl H₂O_{millipore} gelöst werden.

7.6.2 Plasmid-DNA-Midipräparation aus *E. coli*

Für qualitative Analysen, wie beispielsweise Sequenzierungen, oder bei einem Bedarf hoher Mengen an Plasmid-DNA, wurden Plasmide über eine Plasmid-DNA-Midipräparation gereinigt. Dies erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Plus Midi Kits (Qiagen GmbH, Hilden), welcher nach Herstellerangaben verwendet wurde.

7.7 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung von DNA-Enden

Verdaut wurden in der Regel die Plasmide pJoe und pET 29b, um die durch PCR generierten Fragmente (mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen) einzufügen. Zu diesem Zweck wurde der Vector pJoe mit SmaI als Einzelverdau und der Vector pET 29b als Doppelverdau mit den Enzymen NdeI und KpnI, oder in anderen Ansätzen mit NdeI und XhoI, bzw. NdeI und BamHI, verdaut. Für einen Einzelverdau mit SmaI wurde folgender Ansatz pipettiert:

Substanz	Volumen
pJoe (ca. 1 µg/µl)	20 µl
10 x Tango Puffer	5 µl
SmaI (10 U/µl)	4 µl
H ₂ O _{millipore} , DNA-frei	ad to 50 µl

Der Verdau wurde für mindestens 3 Stunden (gegebenenfalls über Nacht) bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Restriktionsverdaus über eine präparative Agarosegelelektrophorese getrennt, die gesuchten Banden mit Hilfe eines Skalpell ausgetrennt und über einen Geextraktionskit (E.Z.N.A.TM Gel Extraction Kit, Omega Bio-Tek) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Für einen Doppelverdau wurden in der Regel 50 µl Ansätze nach folgendem Schema pipettiert:

Substanz	Volumen
pET 29b (ca. 0,3 µg/µl)	30 µl
10 x NEBuffer 1,3 oder 4	5 µl
NdeI (20 U/µl)	2 µl
BamHI (20 U/µl), KpnI (10 U/µl) oder XhoI (10 U/µl)	2 µl
100 x BSA	0,5 µl
H ₂ O _{millipore} , DNA-frei	ad to 50 µl

Dabei wurde darauf geachtet, den für den Doppelverdau passenden 10 x NEBuffer zu wählen. Zudem war es wichtig, die Enzymkonzentration stets unter 10 % des Endvolumens zu belassen, um eine mögliche Staraktivität der Enzyme zu verhindern. Die Ansätze wurden bei 37°C für mindestens 3 Stunden (bis zu über Nacht) inkubiert. Um eine Religation von Vektormolekülen während der Ligation zu verhindern, wurde der pET 29b Vektor nach dem Verdau dephosphoryliert (Sambrook *et al.*, 1989). Zu diesem Zweck wurden dem Restriktionsansatz 5 µl 10 x Antarctic Phosphatase Reaktionspuffer sowie 3 µl Antarctic Phosphatase zugegeben und der Ansatz für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einer fünfminütigen Hitzeinaktivierung bei 65°C in einem zirkulierenden Wasserbad (Thermoinkubator, Haake DC3, Haake, Karlsruhe), wurden die Fragmente über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die gewünschten Banden isoliert und über einen Gelextraktionskit (E.Z.N.A.TM Gel Extraction Kit, Omega Bio-Tek) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

7.8 Ligation

Für eine Ligation wurden maximal 100 ng Gesamt-DNA eingesetzt. Nach Berechnung der jeweiligen DNA-Mengen bzw. Volumina von Vektor und Insert, nach einem Vektor:Insert-Verhältnis von 1:3, wurde der Ansatz in 15 µl Gesamtvolumen angesetzt. Dazu wurden die berechneten Volumina von Vektor und Insert; 1,5 µl 10 x T4 DNA Ligase Puffer und 1 µl T4 DNA Ligase vermischt und mit H₂O_{millipore} auf 15 µl aufgefüllt. Die Ligation fand daraufhin bei 16°C über Nacht statt.

7.9 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Für Transformationsexperimente wurden sowohl elektrokompente als auch chemisch kompetente *E. coli*-Zellen gebraucht.

7.9.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen

Zur Herstellung der elektrokompetenten Bakterienzellen wurden *E. coli* DH10B-Zellen über Nacht bei 37°C in 50 ml LB-Medium angezogen. Am nächsten Tag wurden 500 ml auf 30°C vorgewärmtes LB-Medium mit der Übernachtskultur zu einer optischen Dichte (Wellenlänge 600 nm) von 0,1 angeimpft. Dieser Ansatz wurde bei 30°C unter Schütteln bei 250 Upm so lange inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 0,6 erreicht war. Nach dieser Inkubation wurde der Ansatz in 50 ml Aliquots gespalten und für 15 Min. auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden bei 4°C für 10 Min. bei 4.600 Upm (Ch. 2454-Rotor, Heraeus Multifuge 3L-R, Buckinghamshire, U.K.) pelletiert und das Bakterienpellet in je 50 ml eiskaltem H₂O_{millipore} resuspendiert. Nach einer weiteren 15minütigen Inkubation auf Eis wurde ein analoger Zentrifugationsschritt durchgeführt und die Zellen mit je 20 ml eiskaltem H₂O_{millipore} gewaschen. Dies wurde noch zwei weitere Male durchgeführt, wobei die Bakterienzellen zuerst in 10 ml H₂O_{millipore} und letztlich in 1 ml H₂O_{millipore} zusammengefasst wurden. Anschließend wurden die Zellen in Aliquots zu je 40 µl portioniert und konnten entweder sofort für eine Elektroporation verwendet, oder durch Zugabe von 10 % (v/v) Glycerin bei -80°C gelagert werden.

7.9.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

<u>TSS-Puffer</u>	PEG	10 % (w/v)
	DMSO	5 % (v/v)
	MgSO ₄	25 mM
	mit LB-Medium auffüllen und sterilfiltrieren, pH (ergibt sich)	

Zur Durchführung einer chemischen Transformation wurden chemisch kompetent gemachte *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS-Zellen benötigt. Diese wurden nach einem Protokoll von Chung *et al.* (1989) stets frisch hergestellt.

Auch hier wurde eine Übernachtskultur von *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS-Zellen in 50 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln bei 250 Upm bebrütet. Aus dieser Übernachtskultur wurden 30 ml LB-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4–0,55 unter analogen Bedingungen inkubiert. Nach einem 15minütigen Inkubationsschritt auf Eis wurden die Zellen bei 4°C für 10 Min. bei 2.500 Upm pelletiert (Ch. 2454-Rotor, Heraeus Multifuge 3L-R, Buckinghamshire, U.K.) und in 3 ml eiskaltem TSS-Puffer resuspendiert. Die so behandelten Zellen konnten im Anschluss sofort für chemische Transformationsexperimente verwendet werden.

7.10 Transformation von Plasmiden in kompetente *E. coli*-Zellen

Im Zuge dieser Arbeit wurden zwei Transformationsmethoden benutzt um Plasmide in kompetente Bakterienzellen zu überführen. Dabei handelte es sich einerseits um Elektroporation, andererseits um chemische Transformation.

7.10.1 Elektroporation

Elektroporation wurde in allen Fällen verwendet, in denen Ligationsprodukte in *E. coli* DH10B-Zellen transformiert werden sollten. Im Zuge der Elektroporation war der erste Schritt eine Dialyse des Ligationsproduktes für 30 Min. gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$, was mit Hilfe von Dialyseplättchen (MFTM-Membrane Filters, Filter Type 0,025 μm VSWP, Millipore, Eschborn) in Petrischalen durchgeführt wurde. Im Anschluss wurden 40 μl elektrokompetente *E. coli* DH10B-Zellen (entweder frisch hergestellt oder auf Eis aufgetaut) mit 5 μl des Ligationsproduktes vermischt und der Ansatz unmittelbar in vorgekühlte 2 mm Küvetten für Elektroporation (Biorad, München) überführt. Die Elektroporation fand bei 2500 V (Kapazität wird durch das Gerät festgelegt) in einer Gene Pulser Xcell von Biorad statt. Daraufhin wurde die Bakteriensuspension mit 1 ml LB-Medium vermischt und zur Regeneration für 45 Min. bei 37°C unter 250 Upm geschüttelt. Im Anschluss wurden die Bakterien für 3 Min. bei 3000 Upm in der Tischzentrifuge (5417C, Eppendorf AG, Hamburg) abzentrifugiert, $\frac{3}{4}$ des Überstandsvolumens abgenommen und das Pellet im Restmedium sanft resuspendiert. Im letzten Schritt wurde die Bakteriensuspension auf vorgewärmte LB-Platten, welche das geeignete Antibiotikum zur Selektion enthielten, plattiert. Hierfür wurden pro Transformationsansatz zwei Platten verwendet, auf welche einerseits $\frac{1}{10}$ der Suspension, im anderen Fall $\frac{9}{10}$ der Suspension ausplattiert wurden. Eine Inkubation fand über Nacht bei 37°C statt.

7.10.2 Chemische Transformation

Eine chemische Transformation wurde immer dann verwendet, wenn Plasmide in den Expressionsstamm *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS gebracht werden sollten. Zu diesem Zweck wurden 100 μl der chemisch kompetenten *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS-Zellen mit 1-2 μl (entspricht ca. 500 ng) des gewünschten Plasmids vermischt und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 Sek. bei 42°C wurde die Suspension für weitere 3 Min. auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zugabe von 1 ml LB-Medium und eine Regeneration der Zellen für 45 Min. bei 37°C unter Schütteln bei 250 Upm. Im Anschluss wurden die Zellen für

3 Min. bei 3000 Upm abzentrifugiert (5417C, Eppendorf AG, Hamburg) und wie unter Kap. II.7.10.1 beschrieben auf entsprechende LB-Platten ausplattiert und bebrütet.

7.11 Screening der Klone

Waren nach der Transformation Klone auf den LB-Platten zu detektieren, wurden sie mit einer sterilen, gelben Pipettenspitze aufgenommen und in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt. Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht unter Schütteln bei 250 Upm wurden Plasmid-DNA-Minipräparationen durchgeführt (s. Kap. II.7.6.1). Die Plasmide wurden mit Hilfe von Test-Restriktionsverdaus auf das Vorhandensein des richtigen Inserts überprüft. Die Verdaus wurden als Einzel- bzw. Doppelverdaus angesetzt und bei den für die Enzyme optimalen Temperaturen für 1 Stunde inkubiert. Es wurden jeweils 10 µl Ansätze pipettiert die 0,5 µg Plasmid-DNA, 1 µl 10 x Reaktionspuffer; 0,1 µl 100 x BSA (falls erforderlich) und je 1 µl von einem bzw. zwei der folgenden Enzyme enthielten: NdeI, KpnI, BamHI, SmaI, PvuI, XcmI, MluI, XbaI, FspI. Zeigten die Testverdaus das erwartete Restriktionsmuster wurde eine Plasmid-DNA-Midipräparation (s. Kap. II.7.6.2) durchgeführt und die Plasmid-DNA sequenziert.

7.12 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen von PCR-Produkten und Plasmiden wurde bei der Firma Entelechon GmbH (Regensburg) durchgeführt. Für eine Sequenzierung von PCR-Produkten wurden ca. 200 ng DNA benötigt, welche zuvor wie unter Kap. II.7.5 beschrieben aufgereinigt wurde. Eine Sequenzierung von Plasmiden erfolgte nach der unter Kap. II.7.6.2 beschriebenen Aufreinigung. Hierfür wurden mindestens 800 ng DNA benötigt, welche eine Mindestkonzentration von 150 ng/µl aufweisen musste. Für manche Sequenzierungen war das Mitliefern von Primern erforderlich, welche zu diesem Zweck auf eine Konzentration von 10 µM eingestellt wurden.

7.13 Herstellung von Glycerinkulturen

Wiesen die sequenzierten Plasmide die richtige DNA-Sequenz auf, wurden sie mit den zugehörigen *E. coli*-Stämmen als Glycerinkultur hinterlegt. Zu diesem Zweck wurden 600 µl einer über Nacht gewachsenen Kultur mit 300 µl sterilem, 99%igem Glycerin vermischt und der Ansatz in Kryoröhrchen (Cryo Pure Tube, Sarstedt, Nümbrecht) bei -80°C gelagert.

8 Expression

<u>LEW-Puffer</u>	NaCl	300 mM
	NaH ₂ PO ₄	50 mM
	pH 8,0 – mit 10 N NaOH einstellen	

Transformierte Expressionsstämme, bei denen durch Sequenzierung das richtige Insert festgestellt werden konnte, wurden zunächst in Form einer Testexpression untersucht. Dazu wurden die Bakterien in 50 ml LB-Medium mit Kanamycin und Chloramphenicol angeimpft und bei 37°C über Nacht bei 250 Upm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 250 ml des mit den gleichen Antibiotikas versetzten LB-Mediums auf eine optische Dichte (Wellenlänge 600 nm) von 0,1 angeimpft und bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 250 Upm geschüttelt. Im Anschluss wurde der Ansatz in 15 ml Aliquots gespalten und die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Als Kontrolle diente ein Ansatz, welcher nicht mit IPTG induziert wurde. Die Kulturen wurden bei Temperaturen von 15°C, 20°C, 30°C oder 37°C für unterschiedliche Zeiträume bei 250 Upm geschüttelt und anschließend bei 4.600 Upm für 30 Min. bei 4°C abzentrifugiert (Ch. 2454-Rotor, Heraeus Multifuge 3L-R, Buckinghamshire, U.K.). Das Pellet konnte nach diesem Schritt bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden. Im nächsten Schritt wurde das Pellet in 375 µl LEW-Puffer resuspendiert und dreimal für 20 Sek. mit Ultraschall (20 %, Bandelin Sonoplus, Bandelin Electronic, Berlin) behandelt, wobei die Ansätze zwischen den einzelnen Pulsen auf Eis gekühlt wurden. Von diesem Rohextrakt wurden 100 µl abgenommen und bei 4°C für 30 Min. bei 14.000 Upm abzentrifugiert (Himac CT15RE, Hitachi Koki Co., Ltd, Japan). Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene Pellet in 100 µl LEW-Puffer gelöst. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden Aliquots dieser Fraktionen, nach Zugabe eines adäquaten Volumens von Probenpuffer (s. Kap. II.6.2.2), bei 95°C für 10 Min. im Wasserbad denaturiert und über SDS-PAGE (s. Kap. II.6.2) und Western Blot (s. Kap. II.6.3) analysiert. Zudem erfolgte eine Sequenzierung der Proteinbanden (s. Kap. II.6.5) um eine korrekte Synthese zu bestätigen.

Nachdem die besten Bedingungen für die Synthese der gewünschten Proteine bestimmt waren, wurden Expressionen in größerem Maßstab (500 ml oder 1 L) angesetzt. Die Bakterien wurden analog zu den Testexpressionen angezogen, wobei die optimale Inkubationstemperatur sowie die optimale Inkubationsdauer verwendet wurden. Danach wurden die Bakterien bei 4°C für 30 Min. bei 4.600 Upm abzentrifugiert (Ch. 2454-Rotor, Heraeus Multifuge 3L-R, Buckinghamshire, U.K.) und bis zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine bei -20°C gelagert.

9 Aufreinigung der rekombinanten Proteine

9.1 Aufreinigung über Affinitätschromatographie

Alle rekombinanten Proteine besaßen einen aus sechs konsekutiven Histidinresten bestehenden C-terminalen His-Tag, der deren Aufreinigung erleichtern sollte. Zu diesem Zweck wurden die Proteine nach einer Synthese im großen Maßstab (s. Kap. II.8) im ersten Schritt über Protino® Ni-TED 150 oder Protino® Ni-TED 2000 packed columns (Machery-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Das Aufreinigungsprinzip beruht dabei auf einer Wechselwirkung zwischen dem Polyhistidin-Tag der rekombinanten Proteine und immobilisierten Ni^{2+} -Ionen, die sich an der Säulenmatrix befinden. Die rekombinanten Proteine besitzen eine hohe Affinität zu diesen Ni^{2+} -Ionen, binden daran und können nach mehreren Waschschritten durch Zugabe des Histidin-Analogs Imidazol kompetitiv verdrängt und somit eluiert werden.

Zeigte sich eine überwiegende Synthese der rekombinanten Proteine im Pellet, wurde das Protokoll des Herstellers zur Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen befolgt. Zeigte sich durch Western Blot-Analysen, dass die gewünschten Proteine in ausreichender Menge im Überstand vorhanden waren, wurde bevorzugt das Protokoll zur Aufreinigung unter nativen Konditionen verwendet. Im Anschluss wurden die Eluatfraktionen, in der sich die rekombinanten Proteine befinden sollten, über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. Kap. II.6.2) auf deren Reinheit analysiert und die gesuchten Proteine gegebenenfalls sequenziert (s. Kap. II.6.5).

9.2 Proteolytischer Verdau und weitere Aufreinigung

Neben einem C-terminalen His-Tag wiesen manche Konstrukte zusätzlich eine Thrombinschnittstelle auf, die sich N-terminal zum His-Tag befand. Diese Proteine wurden zunächst, wie zuvor beschrieben, über Protino® Ni-TED 2000 packed columns (Machery-Nagel, Düren) aufgereinigt. Da ein störender Einfluss des His-Tags auf später durchzuführende Polymerisationsversuche nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde dieser durch einen Verdau mit der Serin-Protease Thrombin entfernt. Dazu wurden die jeweiligen rekombinanten Proteine mit 1 Unit Thrombin pro mg exprimiertem Protein über Nacht bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln (Thermomixer 5436, Eppendorf AG, Hamburg) verdaut. Im Anschluss erfolgte eine Inaktivierung des Thrombins für 15 Min. bei 80°C in einem zirkulierenden Wasserbad (Thermoinkubator, Haake DC3, Haake, Karlsruhe). Nach Zugabe von 1 mM PMSF wurde der entfernte His-Tag nach Herstellerangaben über Protino® Ni-TED 150 packed columns abgereinigt, wobei sich die gesuchten Proteine im Durchlauf

befinden sollten. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die einzelnen Ansätze über SDS-Gelelektrophorese (s. Kap. II.6.2) auf deren Reinheit überprüft und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

10 Polymerisationsstudien

Mit Hilfe von Polymerisationsstudien sollte gezeigt werden, ob die rekombinant erzeugten Iho670-Proteinvarianten *in vitro* zur Polymerisation fähig sind. Zu diesem Zweck wurden die Proteine mit zweiwertigen Ionen in einem saueren Milieu für unterschiedliche Zeiträume bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert.

Die Polymerisationsansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

Substanz	Volumen
aufgereinigte Proteinlösung der Iho670-Konstrukte	46 µl
HCl (1 N)	1 µl
NaN ₃ (100 mM)	1 µl
MgCl ₂ (1 M)	1 µl
CaCl ₂ (1 M)	1 µl

Dabei wurde HCl dafür benötigt einen pH von 5,5-6 einzustellen, der dem optimalen pH zur Kultivierung von *Ignicoccus*-Zellen entspricht. Eine Zugabe von NaN₃ sollte das Wachstum von Fremdorganismen während der Inkubationsphasen verhindern. Die Polymerisationsansätze wurden für einen Tag, 3 Tage, 7 Tage oder 14 Tage bei Temperaturen von 4°C, RT, 37°C, 60°C oder 90°C inkubiert, wobei für jeden Polymerisationsansatz pro Temperatur und Zeitintervall ein eigener Ansatz vorgelegt wurde. Ansätze die bei 60°C bzw. 90°C inkubiert wurden, wurden mit Mineralöl überschichtet, um ein vorzeitiges Verdampfen der Probe zu verhindern. Zudem wurden Kontrollexperimente, die ohne eine Zugabe von zweiwertigen Ionen angesetzt wurden, unter analogen Bedingungen inkubiert. Eine weitere Kontrolle stellte ein Ansatz ohne Proteinlösung (ersetzt durch Puffer) dar, um bei der elektronenmikroskopischen Analyse eventuelle Effekte der Pufferlösung auszuschließen.

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurde eine Polymerisation sowohl elektronenmikroskopisch, über die Analyse von Suspensionspräparaten (s. Kap. II.13.1), als auch proteinbiochemisch, über Western Blots mit Immunmarkierungen mit dem rabbit anti-Iho670 Antikörper (s. Kap. II.6.3), untersucht. Dabei wurde im Falle einer proteinbiochemischen

Analyse auf eine Hitzedenaturierung der Proteine, im Vorfeld der elektrophoretischen Auftrennung, verzichtet. Weiterhin wurde Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol verwendet, der zudem einen reduzierten SDS-Anteil von nur 0,5 % (w/v) aufwies.

11 Generierung polyklonaler Antikörper

Zur Generierung polyklonaler Antikörper wurde das mit einem His-Tag rekombinant erzeugte Protein Igni_0668_{rek}, nach erfolgter Aufreinigung über Affinitätschromatographie, (s. Kap. II.9.1) über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. Kap. II.6.2) aufgetrennt und mit einer modifizierten Coomassie-Färbung angefärbt.

Modifizierte Coomassie-Färbung für Immunisierung (Schägger und von Jagow, 1987):

Schritt	Substanz	Konzentration	Dauer
Fixierung	Ethanol	50 % (v/v)	30 Min.
	Essigsäure	10 % (v/v)	
Färbung	Coomassie G 250	0,025 % (w/v)	30 Min.
	Essigsäure	50 % (v/v)	
Entfärbung	Ethanol	30 % (v/v)	bis Banden sichtbar
	Essigsäure	10 % (v/v)	

Nach der Färbung bzw. Entfärbung des SDS-Gels wurden die entsprechenden Banden mit einem Einmalskalpell ausgeschnitten und in 5%iger (v/v) Essigsäure zur Firma Davids Biotechnologie (Burgweinting) gebracht, wo die Immunisierung in Kaninchen und Huhn stattfand.

12 Cleavage Assay

Wie bereits in Müller *et al.* (2009) beschrieben, scheint das unprozessierte Iho670-Protein mit einem Signalpeptid gebildet zu werden, dessen Länge laut bioinformatischer Vorhersage, je nach verwendetem Algorithmus, variiert. Ein Fehlen dieses Signalpeptides im reifen Fiberprotein gibt einen Hinweis darauf, dass das Protein im Verlauf der Fiberassemblierung prozessiert wird. Mit Hilfe eines sogenannten Cleavage Assays (Albers *et al.*, 2003; Szabó *et*

al., 2007) sollte das Protein Igni_1405, das für die Prozessierung verantwortlich zu sein scheint, auf dessen Peptidase-Aktivität untersucht werden. Dabei wurden alle notwendigen Versuche, wie unter Szabó *et al.* (2007) beschrieben, von S.-V. Albers am Max Plank Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg ausgeführt.

Im ersten Schritt wurde *igni_1405* in zwei Vektoren kloniert, von welchen ein Vektor das Gen *sso_0118* enthielt. *Sso_0118* codiert dabei für ein Pilin aus *Sulfolobus solfataricus* (Fröls *et al.*, 2008). Der zweite Vektor enthielt neben *igni_1405* ein *flaB*-Gen, welches für ein Flagellinprotein codiert. Im nächsten Schritt wurden die Vektoren in Bakterienstämmen exprimiert, wobei zuerst die Expression der Substrate *sso_0118* bzw. *flaB* durch Zugabe von L-Arabinose induziert wurde. Nach zweistündiger Synthese dieser Proteine wurde die Expression von *igni_1405* durch Zugabe von IPTG induziert und die Expression nach weiteren 2 Stunden beendet. Zur Kontrolle diente jeweils ein Vektor, in welchem *sso_0118* bzw. *flaB* ohne die Anwesenheit von *igni_1405* zur Expression gebracht wurden. Zudem wurde eine Kontrolle mitgeführt, in welcher *flaB* vor der *Sulfolobus*-Peptidase *pibD* exprimiert wurde, um einen Vergleich mit der Spaltung durch Igni_1405 anstellen zu können. Nach den entsprechenden Expressionszeiten wurden die Kulturen abzentrifugiert, eine Membranpräparation durchgeführt und die Prozessierung der Proteine Sso_0118 bzw. FlaB durch die Peptidasen mittels Western Blot Analysen untersucht.

13 Elektronenmikroskopische Präparationstechniken

13.1 Herstellung und Kontrastierung von Suspensionspräparaten

<u>Uranylacetat-Lösung</u>	UAc	2 % (w/v)
	Essigsäure	0,1 % (v/v)
	pH 4 (ergibt sich)	

Suspensionspräparate wurden vor allem zur Analyse von Proteinsuspensionen aus CsCl-Gradienten oder zur Analyse der Polymerisationsexperimente (s. Kap. II.10) verwendet. Dabei wurden zuerst kohlebeschichtete Kupfer-Trägernetzchen (G2400C, Plano, Wetzlar) in einem Plasma Cleaner (Plasma Cleaner/Sterilizer PDC-3XG, Harrick Plasma, Ithaca, USA) hydrophilisiert und mit Klemmpinzetten fixiert. Danach wurden 10 µl der Proteinsuspension auf das Grid pipettiert und diese nach einer 20sekündigen Inkubation durch seitliches Annähern an ein Filterpapier abgesaugt. Die Kupfernetzchen wurden zweimal kurz mit H₂O_{millipore} gewaschen und für 30-45 Sek. in einem Tropfen essigsaurer, 2%iger (w/v) Uranylacetat-Lösung schwermetallkontrastiert. Nach erneutem Abziehen der Uranylacetat-

Lösung wurden die Grids luftgetrocknet und konnten daraufhin im TEM (Transmissions-elektronenmikroskop) analysiert werden.

Auf Goldgrids gewachsene Organismen konnten nach entsprechender Anzucht (s. Kap. II.4.3) ebenfalls schwermetallkontrastiert werden. Zu diesem Zweck wurden die Serumflaschen geöffnet, die Grids aus den Teflonhaltern entfernt und zweimal in einem Tropfen oxischem $\frac{1}{2}$ SME-Medium gewaschen. Eine Kontrastierung fand für 1 Minute mit essigsaurer, 2%iger (w/v) Uranylacetat-Lösung statt. Sollten nach einer Aufzucht auf kohlebeschichteten Goldgrids gezielt hypothetische Verankerungsstrukturen der Fibers erhalten werden, wurden die Grids vor der Kontrastierung für 2 Stunden in oxischem $\frac{1}{2}$ SME-Medium mit einem pH von 6,75 geschüttelt, bevor die Kontrastierung wie zuvor beschrieben durchgeführt wurde.

13.2 Gefrierätzung

Den ersten Schritt der Gefrierätzung stellte eine schonende Aufkonzentrierung von *I. hospitalis*-Zellen dar, um die labilen Fibers so gut wie möglich zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden 20 ml einer frischen, gut bewachsenen Kultur für 15 Min. bei 4.500 Upm (JA 25.50-Rotor, 4 °C, Beckman Avanti® J-26 XP, Beckman Coulter, Fullerton, USA) abzentrifugiert und das Pellet in einem kleinen Volumen des Zentrifugationsüberstandes vorsichtig resuspendiert. Danach wurden 2 µl der Zellsuspension auf einen Goldträger (Bal-Tec, Witten/Ruhr) pipettiert und unmittelbar in flüssigem Stickstoff kryofixiert. Goldträger samt Probe wurden unter flüssigem Stickstoff auf einen Probenhalter montiert, in eine auf -178 °C vorgekühlte Bedampfungskammer (CFE-50 Cressington Ltd., Watford, UK; Kammerdruck: $< 1 \times 10^{-6}$ mbar) geschleust und auf einer entsprechenden Haltevorrichtung arretiert. Im Anschluss wurde die Temperatur in der Kammer auf -97 °C erhöht und die Probe für 7 Min. bei dieser Temperatur inkubiert, um einen Temperaturangleich zu ermöglichen, bevor sie mit einem auf ca. -180 °C gekühlten Messer schichtweise gebrochen wurde. Nach vierminütiger Sublimation des Oberflächenwassers (Ätztiefe ca. 400 nm) mit Hilfe des über die Probe geschwenkten Messerblockes, welcher als Kühlfalle diente, wurde die Probe mit einer 1 nm dicken Platin/Kohle-Schicht in einem Winkel von 45° bedampft. Eine weitere Bedampfung mit einer ca. 10 nm dicken Kohleschicht in einem Winkel von 90° sollte der Stabilisierung der Probe dienen. Die bedampften Proben wurden ausgeschleust und in 70%iger (v/v) H₂SO₄ abflottiert, um organische Reste über Nacht zu entfernen. Nach zweimaligem Waschen der Replikas in H₂O_{millipore} wurden sie auf hydrophilisierte, hexagonale Kupfergrids (G700HEX, Plano, Wetzlar) aufgenommen und luftgetrocknet.

13.3 Herstellung von Ultradünnschnitten

Zur Herstellung von Ultradünnschnitten wurden *Ignicoccus*-Zellen sowie die Co-Kultur Kin4/M aus *I. hospitalis* und *N. equitans* hochdruckgefroren, gefriersubstituiert und in das Kunstharz Epon eingebettet. Die einzelnen Schritte zur Herstellung von Ultradünnschnitten werden in Folgendem näher erläutert.

13.3.1 Probenvorbereitung und *High-Pressure-Freezing* (HPF)

Die Zellen, die über Hochdruckgefrierung kryofixiert werden sollten, wurden wie unter Kap. II.4 beschrieben angezogen. Zellen, die in Serumflaschen kultiviert wurden, wurden bei 4 °C unter schonenden Bedingungen (15 Min., 4.500 Upm, JA 25.50-Rotor, Beckman Avanti® J-26 XP, Beckman Coulter, Fullerton, USA) abzentrifugiert und in einem kleinen Volumen Überstand verdünnt, so dass ein gerade noch pipettierbares Pellet entstand. 2 µl dieser Suspension wurden auf einen goldbeschichteten Flachpräparatehalter (Tiefe 200 µm, Innendurchmesser 1,5 mm, Leica, Wetzlar) pipettiert, in einen zugehörigen Bajonetthalter (Leica, Wetzlar) eingespannt und unverzüglich in die Probenschleuse des Hochdruckgefrierers EM PACT 2 (Leica, Wetzlar) eingebracht. Der Bajonetthalter wurde mechanisch fixiert und der Einfriervorgang bei einem Druck von ca. 2000 bar innerhalb von Millisekunden durchgeführt. Da durch diese Methode innerhalb eines kurzen Zeitraums sehr viele Zellen für eine Analyse gewonnen werden konnten, welche jedoch zentrifugationsbedingte Schäden aufweisen könnten, wurden diese Präparate vor allem zur Optimierung der jeweiligen Versuchsbedingungen (z. B. zur Ermittlung der optimalen Antikörperverdünnungen) herangezogen.

In Cellulosekapillaren angezogene Zellen wurden zunächst phasenkontrastmikroskopisch kontrolliert und bei ausreichender Zelldichte in eine Petrischale mit 20%iger (w/v) BSA-Lösung überführt. Die Cellulosekapillaren wurden mit einem an der Vorderseite senkrecht angeschliffenen Skalpell in ca. 1 mm lange Fragmente geschnitten und je drei dieser Teilstücke in die Einbuchtung eines mit 20%iger (w/v) BSA-Lösung gefüllten Flachpräparathalters (Tiefe 200 µm, Innendurchmesser 1,5 mm, Leica, Wetzlar) gelegt. Der Goldträger wurde in einen Bajonetthalter eingespannt und die Probe wie zuvor beschrieben hochdruckgefroren.

Nach der Hochdruckgefrierung war es unbedingt notwendig, die Proben durchgehend in flüssigem Stickstoff zu lagern, um eine Rekristallisierung des intrazellulären Wassers und eine damit einhergehende Schädigung der Zellstruktur zu verhindern.

13.3.2 Gefriersubstitution

<u>Substitutionslösung EGFU</u>	Ethanol	93 % (v/v)
	Glutardialdehyd	0,5 % (v/v)
	Formaldehyd	1 % (w/v)
	UAc	0,5 % (w/v)
	pH (ergibt sich)	

Die Gefriersubstitution diente dem Austausch des intrazellulären Wassers gegen ein Dehydratisierungsmittel, welches mit dem unpolaren Einbettungsreagenz Epon mischbar ist. Den ersten Schritt der Gefriersubstitution stellte dabei die Herstellung der Substitutionslösung dar, welche in einer Reagentienwanne mit Durchflussring-Einsatz (beides Leica, Wetzlar) vorgelegt und in der automatischen Gefriersubstitutionsanlage EM AFS 2 (Leica, Wetzlar) auf -140°C vorgekühlt wurde. Die hochdruckgefrorenen Zellen wurden unter flüssigem Stickstoff in die Gefriersubstitutionsanlage transferiert und mit der Proben Seite nach oben auf die gefrorene Substitutionslösung gegeben. Nach einem langsamen Einsinken der Proben wurde die Gefriersubstitution vollautomatisch nach folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	Starttemperatur	Endtemperatur	Anstieg	Zeit
1	-90°C	-90°C	0°C/h	30 h
2	-90°C	-60°C	5°C/h	6 h
3	-60°C	-60°C	0°C/h	8 h
4	-60°C	-30°C	5°C/h	6 h
5	-30°C	-30°C	0°C/h	8 h
6	-30°C	0°C	5°C/h	6 h
7	0°C	0°C	0°C/h	3 h

13.3.3 Infiltration und Einbettung

Einbettungsmittel Epon® 812

Epoxy-Einbettungsmittel	46 % (v/v)
DDSA	28,5 % (v/v)
MNA	25,3 % (w/v)
DMP-30	0,2 % (w/v)

alle Komponenten (außer DMP-30) unter leichtem Rühren mischen,
nach 30 Min. DMP-30 Zugabe und Rühren für weitere 30 Min.

Nach der Gefriersubstitution wurden die Proben mitsamt der Reagentienwanne und dem Durchflussring-Einsatz aus der Gefriersubstitutionsanlage genommen und in ein Eisbad transferiert. Die Substitutionslösung wurde abgesaugt und die Proben dreimal mit eiskaltem Aceton gewaschen, bevor eine Lösung von Epon und Aceton (Verhältnis 1:1) aufgebracht wurde. Nach 2 Stunden wurde diese Lösung durch ein Epon-Aceton Gemisch vom Verhältnis 2:1 ersetzt und die Proben über Nacht bei Raumtemperatur im Abzug inkubiert. Dabei verdampfte das flüchtige Lösungsmittel Aceton, so dass sich die Eponkonzentration kontinuierlich erhöhte. Im nächsten Schritt wurde das Epon-Aceton Gemisch entfernt, die Proben in frisch angesetztem Epon eingebettet, mit einem Datenzettel etikettiert und zunächst für 2 Stunden bei 30°C im Wärmeschrank (Memmert, Schwabach) inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurde die Temperatur auf 60°C erhöht und die Proben für zwei Tage unter diesen Bedingungen inkubiert.

13.3.4 Herstellung pioloformbeschichteter Grids

Zur Aufnahme von Ultradünnschnitten wurden im Vorfeld pioloformbeschichtete Grids hergestellt, die als Trägermaterial für die Ultradünnschnitte dienten. Zu diesem Zweck wurden gereinigte Glasobjektträger senkrecht in die Befilmungsapparatur eines Tropftrichters gestellt, in dessen unterem Gefäß eine Pioloformlösung (1 % (w/v) Pioloform, gelöst in Chloroform) vorgelegt war. Diese Lösung wurde mit Hilfe eines Blasebalgs langsam in die Befilmungsapparatur gepumpt und innerhalb von 28 Sekunden abgelassen, nachdem der Glasobjektträger zu $\frac{3}{4}$ bedeckt war. Der befilmte Objektträger wurde luftgetrocknet, an den Enden mit einer Rasierklinge angeritzt und in einem Winkel von 15° in ein Wasserbad getaucht. Der Pioloformfilm löste sich ab und konnte mit den gewünschten Grids (Kupfer und Nickel Slot Grids, Plano, Wetzlar) belegt werden, wobei die Grids mit der Oberfläche Richtung Pioloformfilm aufgelegt werden mussten. Nach Abnahme des belegten

Pioloformfilms mit Hilfe eines Stück Parafilms konnten die beschichteten Grids an der Luft getrocknet werden.

13.3.5 Vorbereitung der eingebetteten Proben

Nach der Auspolymerisation des Epons mussten die eingebetteten Proben mit Hilfe einer Rasierklinge aus der Reagentienwanne geschnitten werden. Das den Flachpräparatehalter umgebende Epon wurde mit einer Rasierklinge weitestgehend entfernt und die Präparate durch sukzessives Kühlen in flüssigem Stickstoff und einer darauffolgenden Erwärmung auf einer Heizplatte mehreren Temperaturschocks ausgesetzt, so dass sich der Goldträger löste und die eingebettete Probe offenlegte. Ein weiteres Antrimmen war in der Regel nicht erforderlich, so dass die Proben direkt für eine Ultramikrotomie verwendet werden konnten.

13.3.6 Ultramikrotomie

Zur Herstellung der Ultradünnschnitte wurde ein EM UC6 Ultramikrotom (Leica, Wetzlar) bzw. ein Ultracut E Ultramikrotom (Reichert-Jung, Wien) in Verbindung mit einem Diamantmesser (Messerwinkel 45°, Diatome, Biel, CH) verwendet. Dabei wurde das Messer ca. 1 Stunde vor Beginn der Ultramikrotomie mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$ gewässert. Nach dem Einspannen der Probe wurde der Wasserstand des Messers so eingestellt, dass sich eine ebene Oberfläche bildete, auf der die Schnitte aufschwimmen konnten. Daraufhin wurde der Winkel zwischen Probe und Messer optimal justiert, ein Vorschub von 50 nm und eine Schnittgeschwindigkeit von 1 mm/sec eingestellt sowie die Grenzen, die eine langsame Bewegung des Blöckchens am Messer vorbei vermitteln, festgelegt. Der Schnittvorgang wurde gestartet und die Schnittdicke anhand der Lichtreflexion kontrolliert. Erschienen die Schnitte in einer silbrig-grauen Farben, war dies ein Hinweis auf eine Schnittdicke von ca. 50-70 nm, so dass die Schnitte mit Hilfe eines präparierten Kupfer Slot Grids abgefischt und auf pioloform-beschichtete Grids transferiert werden konnten. Der zwischen den Grids befindliche Wassertropfen wurde unter Kontrolle eines Binokulars mit einem Filterpapier abgezogen und die Grids an der Luft getrocknet.

13.3.7 Kontrastierung der Ultradünnschnitte

<u>Bleicitrat-Lösung</u>	Pb(NO ₃) ₂	80 mM
	Natriumcitrat	100 mM
	NaOH (1 N, CO ₂ -frei)	16 % (v/v)
	mit CO ₂ -freiem Wasser auffüllen	
	pH 11,5 – mit 1 N NaOH einstellen	

Ultradünnschnitte, welche nicht für eine Immunmarkierung verwendet wurden, wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat schwermetallkontrastiert.

Hierfür wurden die Ultradünnschnitte mit der Probenseite nach unten auf einen Tropfen essigsaurer, 2%iger (w/v) Uranylacetat-Lösung gelegt und für 20–30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Grids dreimal kurz in einem Tropfen H₂O_{millipore} gewaschen. Zur Kontrastverstärkung erfolgte eine einminütige Inkubation in 0,5%iger (w/v) Bleicitratlösung, wonach die Grids dreimal in einem Tropfen H₂O_{millipore} gewaschen und im Anschluss luftgetrocknet wurden.

13.4 Immunmarkierung an elektronenmikroskopischen Präparaten

<u>PBG-Puffer</u>	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	1,76 mM
	Gelatine	0,2 % (w/v)
	BSA	0,5 % (w/v)
	pH 7,4 – mit 1N HCl einstellen	

Immunmarkierungen an elektronenmikroskopischen Präparaten wurden an Ultradünnschnitten und bewachsenen Goldgrids durchgeführt. Zum größten Teil wurde dabei der rabbit anti-Iho670 Antikörper verwendet, der von der Arbeitsgruppe Wirth bereitgestellt wurde.

Eine Immunmarkierung an den verschiedenen Präparaten lief prinzipiell auf die gleiche Art und Weise ab, zu Modifikationen kam es lediglich in Bezug auf die verwendeten Puffer und die Dauer der einzelnen Schritte. Bei Immunmarkierungen an bewachsenen Goldgrids konnte im Vorfeld der Immunmarkierung ein Hitzeschritt eingefügt werden. Hierfür wurden

die bewachsenen Grids für ca. 20 Min. bei 120 °C im Wärmeschrank inkubiert um Epitope freizulegen, die für den Antikörper bei normaler Präparation nicht zugänglich sind (Dr. Heinz Schwarz, MPI Tübingen, persönliche Mitteilung). Das wesentliche Vorgehen der Immunmarkierung ist in folgender Übersicht zusammengefasst (US: Ultradünnschnitte, BG: bewachsene (kohlebeschichtete) Goldgrids; PBS-Puffer siehe Kap. II.6.4.2):

Schritt	Substanz US	Dauer US	Substanz BG	Dauer BG
Absättigung von Aldehyden	PBS-Glycin 0,1 % (w/v)	5 Min.	-	-
Waschen	-	-	½ SME oxisch	3 x 2 Min.
Blockieren	PBS-BSA 1% (w/v)	5 Min.	PBG	5 Min.
primäre Antikörpermarkierung	AK verdünnt in PBS-BSA 0,1 % (w/v)	45 - 60 Min	AK verdünnt in PBG	25 Min.
Waschen	PBS-BSA 0,1 % (w/v)	5 x 2 Min.	PBG	3 x 2 Min.
sekundäre Antikörpermarkierung	AK verdünnt in PBS-BSA 0,1 % (w/v)	1 Std.	AK verdünnt in PBG	45 Min.
Waschen	PBS-BSA 0,1 % (w/v)	5 x 2 Min.	PBG	3 x 2 Min.
Waschen	PBS	2 x 2 Min.	-	-
Vernetzung von Epitop, prim. + sek. Antikörper	PBS-Glutardialdehyd 2 % (v/v)	5 Min.	PBG-Glutardialdehyd 2 % (v/v)	2 Min.
Waschen	PBS	2 x 2 Min.	PBG	2 x 2 Min.
Waschen	H ₂ O _{millipore}	3 x 2 Min.	H ₂ O _{millipore}	2 x 1 Min.

Die im Laufe der Immunmarkierung benötigten Lösungen wurden tropfenweise auf Parafilm vorgelegt, auf welchen die Präparate im Anschluss, mit der Probenseite nach unten, gelegt wurden. Alle Antikörperlösungen wurden vor Gebrauch frisch hergestellt und für 3 Min. bei 13.000 Upm in einer Tischzentrifuge (5417C, Eppendorf AG, Hamburg) abzentrifugiert. Wurden als sekundäre Antikörper goat anti-rabbit IgGs, gekoppelt an ultra-small Gold verwendet, wurde zusätzlich eine Silberverstärkung wie unter Kap. II.13.5 beschrieben durchgeführt. Im Anschluss wurden die Präparate wie unter Kap. II.13.1 bzw. Kap. II.13.3.7 beschrieben kontrastiert. Als Negativkontrollen wurden stets Ansätze, in denen der primäre

Antikörper weggelassen wurde, mitgeführt. Zudem wurden Immunmarkierungen mit dem Präimmunserum anstelle des primären Antikörpers angefertigt.

13.5 Immunmarkierung der Fibers in Lösung

<u>Silberlactat-Lösung</u>	Silberlactat	0,73 % (w/v)
	150 µl-Aliquots im Dunkeln bei -20 °C lagern	
<u>Gummi arabicum-Lösung</u>	Gummi arabicum	33 % (w/v)
<u>Hydrochinon-Lösung</u>	Hydrochinon	5,7 % (w/v)
<u>Citrat-Puffer</u>	Citrat	25,5 % (w/v)
	Trisnatriumcitratdihydrat	23,5 % (w/v)
	pH 3,8 (ergibt sich)	
<u>Verstärkerlösung</u>	Gummi arabicum-Lösung	70,6 % (v/v)
	Hydrochinon-Lösung	17,6 % (v/v)
	Citrat-Puffer	11,8 % (v/v)
	850 µl-Aliquots bei -20 °C lagern	

Zellanhänge von *I. hospitalis* konnten nach einer Anreicherung über CsCl-Gradientenzentrifugation und Dialyse (s. Kap. II.5) direkt in Lösung immunmarkiert werden. Zu diesem Zweck wurden Fraktionen eingesetzt, die nach elektronenmikroskopischer Kontrolle über Suspensionspräparate (s. Kap. II.13.1) eindeutig Fibers zeigten. 50 µl-Aliquots dieser Fraktionen wurden für 20 Min. bei 13.000 Upm in der Tischzentrifuge (5417C, Eppendorf AG, Hamburg) abzentrifugiert, das Pellet in einem Volumen von 50 µl PBG-Puffer (s. Kap. II.13.4) resuspendiert und für 15 Min. sanft bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach einem analogen Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in PBG-Puffer, in dem der rabbit anti-Iho670 Antikörper im gewünschten Verhältnis verdünnt wurde, resuspendiert und der Ansatz für eine Stunde bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Parallel wurde eine Probe, die keinen primären Antikörper enthielt, mitgeführt. Die Ansätze wurden erneut durch eine analoge Zentrifugation pelletiert und mit PBG-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde eine Verdünnung des sekundären Antikörpers (in PBG) aufgebracht und die Proben für 90 Min. unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine analoge Zentrifugation, nach

welcher das Pellet mit PBG-Puffer gewaschen und in einer Lösung aus PBG mit 2 % (v/v) Glutardialdehyd resuspendiert wurde. Nach einer 10minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden Suspensionspräparate (s. Kap. II.13.1) der Ansätze erstellt. Diese wurden je zweimal in PBG und H₂O_{millipore} gewaschen, bevor eine Kontrastierung stattfand. Handelte es sich um Immunmarkierungen, bei denen ein sekundärer Antikörper, der an 6 nm Goldpartikel gekoppelt war, verwendet wurde, wurden die Grids wie unter Kap. II.13.1 beschrieben schwermetallkontrastiert. Wurden als sekundäre Antikörper goat anti-rabbit IgGs, gekoppelt an ultra-small Gold verwendet, wurde zur Intensivierung des Signals eine Silberverstärkung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde je ein Aliquot der Silberlactat- und der Verstärkerlösung unter Lichtausschluss aufgetaut, die Lösungen vermischt und direkt vor Gebrauch für 3 Min. bei 13.000 Upm in der Tischzentrifuge (5417C, Eppendorf AG, Hamburg) abzentrifugiert. Die Grids wurden im Dunklen für ca. 6 Min. auf einem Tropfen dieser Lösung inkubiert, im Anschluss zweimal auf einem Wassertropfen gewaschen und abschließend für ca. 1 Min. schwermetallkontrastiert.

13.6 Ablöseversuche

Ablöseversuche wurden im Anschluss an die Kultivierung von *Ignicoccus*-Zellen auf kohlebeschichteten Grids (s. Kap. II.4.3) durchgeführt. Dabei wurden die Grids nach der Anzucht entnommen, in eine Tüpfelschale überführt und für 90 Min. in einer Verdünnung des rabbit anti-Iho670 Antikörpers (verdünnt in oxischem ½ SME, pH 6) unter Schütteln inkubiert. Als Kontrollen wurden weitere Grids entweder in sterilem, oxischem ½ SME-Medium oder in einer Verdünnung des rabbit anti-Ihomp1 Antikörpers (verdünnt in oxischem ½ SME) inkubiert. Im Anschluss wurden die Grids für 5 Min. in oxischem ½ SME-Medium gewaschen und wie unter Kap. II.13.1 beschrieben schwermetallkontrastiert, wonach eine Analyse der Grids im Transmissionselektronenmikroskop erfolgte.

14 Mikroskopie

14.1 Phasenkontrastmikroskopie

Eine Phasenkontrastmikroskopie wurde in erster Linie zur Kontrolle des Wachstums von *Ignicoccus*-Zellen oder zur Überprüfung von Zellaufschlüssen eingesetzt. Zu diesem Zweck stand ein Phasenkontrastmikroskop der Firma Zeiss (Zeiss AxioStar plus, Oberkochen) zur Verfügung, welches neben zwei Luftobjektiven (Vergrößerung: 5x und 40x, NA 0,12 und 0,65) auch ein Ölimmersionsobjektiv (Vergrößerung: 100x, NA 1,25) besaß.

Zur Bestimmung der Zellzahl im Medium wurde eine Thomakammer (Tiefe 0,02 mm, Brand, Wertheim) in Verbindung mit einem 40x vergrößernden Objektiv verwendet, mit welchem sich die Zellzahl nach folgender Formel berechnete:

$$\frac{\text{Gesamtzellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{ausgezählte Kleinstquadrate}} \times 2 \times 10^7$$

14.2 Transmissionselektronenmikroskopie

14.2.1 Transmissionselektronenmikroskop

Alle elektronenmikroskopischen Untersuchungen, mit Ausnahme der cryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen, wurden an einem Phillips CM12 Transmissionselektronenmikroskop (FEI & Co., Eidhofen, Niederlande) durchgeführt. Dieses Gerät war mit einer LaB₆-Kathode ausgestattet, welche eine Beschleunigungsspannung von 120 keV ermöglichte. Die digitale Fotodokumentation erfolgte mittels einer Slow-Scan-CCD-Kamera (TEM-1000, TVIPS-Tietz, Gauting) in Verbindung mit dem Microsoft Windows® gestütztem Anwendungsprogramm EM-Menü 4.

14.2.2 Elektronen-Tomographie

Vorbereitung der Grids

Eine Tomographie wurde entweder an Ultradünnschnitten oder Suspensionspräparaten durchgeführt, die bereits schwermetallkontrastiert vorlagen (s. Kap. II.13.1 und II.13.3). Zuerst war es nötig, Referenzmarker zu generieren, was durch Aufbringen von kolloidaler Goldlösung (Durchmesser der Goldpartikel ca. 15 nm) auf die Rückseite der Grids erfolgte. Zu diesem Zweck wurden die Grids hydrophilisiert (Plasma Cleaner/Sterilizer PDC-3XG, Harrick Plasma, Ithaca, USA), mit der Rückseite nach unten auf einen Tropfen kolloidaler Goldlösung aufgelegt, für ca. 30 Sek. darauf inkubiert und die Goldlösung anschließend seitlich mit einem Filterpapier abgesaugt. Das Grid wurde luftgetrocknet und am TEM unter der Einstellung Stereo nach geeigneten Objekten abgesucht.

Aufzeichnung von Kippserien

Stellen, die sich für die Aufzeichnung einer Kippserie eigneten, mussten einen steilen Kippwinkel nach beiden Seiten erlauben. Im Laufe dieser Arbeit wurden Kippserien mit zwei verschiedenen Haltern aufgezeichnet, einerseits mit einem Standardpräparathalter, der einen Kippwinkel von ca. -60° bis +60° zuließ, andererseits mit einem speziellen

Hochkipphalter, der Winkel zwischen -70° und $+70^\circ$ erlaubte. Die Präparate, von denen eine Kippserie aufgezeichnet wurde, wurden anfangs zum höchstmöglichen positiven Winkel gekippt, die entsprechenden Daten aufgezeichnet, zum nächsten Winkel gekippt usw. bis der höchstmögliche negative Winkel erreicht war. Die genaue Winkeleinstellung richtete sich dabei nach dem Saxton-Schema (Saxton *et al.*, 1984), welches ein sukzessive kleiner werdendes Kippinkrement bei höheren Winkeln vorsieht, jedoch die Linearität im Fourier-Raum beibehält. Wichtig war die genaue Dokumentation der aufgezeichneten Winkel, die nach jeder Aufnahme manuell in den Header geschrieben wurden. Die Aufzeichnung der Kippserien fand ausschließlich unter dem Programm EM-Menü 4.0 statt, welches Bilder im TIFF-Format generierte. Diese mussten für die weitere Bearbeitung mit dem Softwarepaket TOM Toolbox (Nickell *et al.*, 2005) als EM-Format exportiert werden. Erfolgte die Bearbeitung über das Programm IMOD (Kremer *et al.*, 1996; Mastronarde, 2006), mussten die erstellten Bilder als MRC-Format vorliegen. Zusätzlich war die Erstellung einer Textdatei der Endung „rawtlt“ von Nöten, welche die bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen verwendeten Winkel enthielt.

Alignierung und Rekonstruktion der Tomogramme

Zur Bildbearbeitung der Tomogramme mussten die Bilder der Kippserie zunächst aligniert werden. Zu diesem Zweck wurden pro Serie, je nach verwendetem Programm, verschiedene Referenzmarker definiert, welche in jedem Bild der Kippserie markiert wurden. Als Referenzmarker dienten dabei die Goldpartikel der kolloidalen Goldlösung, die im Vorfeld auf die Grids gebracht wurden. Anhand dieser Marker war es möglich, eine zueinander ausgerichtete Bildserie zu erstellen. Im nächsten Schritt erfolgte eine Rekonstruktion über die sogenannte weighted-back-projection-Methode (WBP), die bei beiden Software-Programmen möglich war.

Visualisierung

Zur Visualisierung der Tomogramme wurde das Softwarepaket AMIRA (Visage Imaging, Richmond, USA) verwendet, in welches der Bildstapel geladen wurde. Nachdem die entsprechenden Werte der *Voxel size*, welche von den verwendeten Vergrößerungen am TEM abhängen, eingetragen wurden, erfolgte eine Visualisierung der Bilder mit den Modulen *Isosurface* oder *Voltex*, wobei sich *Voltex* im Falle der Tomogramme der Suspensionspräparate als die bessere Darstellungsmethode herausstellte. Bei dieser Methode erfolgte eine vollautomatische Visualisierung des Objektes nach Festlegung des gewünschten Kontrastbereiches des Originalstapels.

Eine weitere Visualisierungsmöglichkeit stellte das Modul *SurfaceView* dar, mit welchem ausgewählte Strukturen der Tomogramme dargestellt werden konnten. Hierfür war es zuerst

notwendig, die einzelnen Strukturen unter dem Modul *LabelFields* als *New Materials* zu definieren und diese mit Hilfe des Pinsel-Werkzeuges in allen Bildern des Stapels zu umranden. Auf diese Weise konnten beliebig viele Strukturen voneinander unterschieden und mit unterschiedlichen Farben dargestellt werden. Nach der Markierung der gewünschten Bestandteile wurde ein *Resampling*-Schritt durchgeführt, bevor zusätzliche, virtuelle Schnitte zwischen die einzelnen Bilder des Stapels gelegt wurden. Nach verschiedenen Glättungsschritten wurden die Oberflächen der markierten Strukturen berechnet, welche abschließend unter dem Modul *SurfaceView* in verschiedenen Ansichten dargestellt werden konnten.

14.2.3 Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie

Im Rahmen der 3-dimensionalen Rekonstruktion des Filaments der Fibers von *I. hospitalis* wurden in Kooperation mit Edward H. Egelman und Xiong Yu (Universität von Virginia) Aufnahmen von gefrorenen, hydratisierten, unkontrastierten Fibers erstellt. Zu diesem Zweck wurde ein Cryo-Transmissionselektronenmikroskop der Firma Tecnai verwendet, welches mit einer Feldemissionskathode (FEG-TEM, *field emission gun*) ausgestattet war und bei 200 keV betrieben wurde. Die Aufnahmen wurden auf Negativen aufgezeichnet und diese mit einer Nikon Coolscan 8000 als 16-bit TIFF-Bilder digitalisiert.

14.2.4 Bildbearbeitung und IHRSR (*Iterative helical real space reconstruction*)

Für eine 3-dimensionale Rekonstruktion des Fiberfilaments von *I. hospitalis* wurden sowohl elektronenmikroskopische Daten von negativkontrastierten Fibers, als auch cryo-elektronenmikroskopische Aufnahmen von hydratisierten Fibers, die in unkontrastiertem Zustand vorlagen, ausgewertet. Ebenso erfolgte eine 3-dimensionale Rekonstruktion der Zellanhänge von *I. pacificus*, für welche ausschließlich elektronenmikroskopische Bilder von negativkontrastierten Filamenten verwendet wurden.

Alle negativkontrastierten Aufnahmen wurden von dem unter Kap. II.14.2.1 beschriebenen Elektronenmikroskop aufgezeichnet. Bestimmte Filamentbereiche wurden mit Hilfe der EM-Menü 4 Software maskiert und die Fourier-Spektren dieser Bereiche aufgezeichnet. Im Anschluss wurde eine Auswahl der Bilder zur Auswertung an Prof. Edward H. Egelman geschickt. Dabei handelte es sich um 1024 x 1024 Pixel große Bilder im 16-bit TIFF-Format, welche einen Header von 63838 Byte einnahmen. Die Pixelgrößen der Bilder betrugen dabei entweder 0,58 nm oder 0,46 nm. Im Anschluss wurden die Bilder mit Hilfe des IHRSR-Algorithmus wie unter Egelman (2007) beschrieben, ausgewertet. Für eine Rekonstruktion des Fiberfilaments von *I. hospitalis* wurden dabei verschiedene Aufnahmen gleicher

Pixelgröße für die Berechnung verwendet, im Falle von *I. pacificus* diente eine Aufnahme mit mehreren Filamenten als Grundlage. Durchschnittliche Power-Spektren wurden im Fall von negativkontrastierten *I. hospitalis* Fibers aus 1284, im Falle von *I. pacificus* aus 279 überlappenden Segmenten erstellt, wobei jedes Segment eine Länge von 100 Pixel einnahm. Alle Segmente wurden zueinander ausgerichtet (*aligned*) und innerhalb eines schmalen Bereiches maskiert, was eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses bewirkte.

Die Aufnahme der cryo-elektronenmikroskopischen Bilder erfolgte wie unter Kap. II.14.2.3 beschrieben im Labor von Edward E. Egelman. Auch hier erfolgte eine Auswertung unter anderem mit Hilfe des IHRSR-Algorithmus wie unter Craig *et al.* (2006) beschrieben, was zu einer 3-dimensionalen Rekonstruktion des Fiberfilaments führte. Zur besseren Veranschaulichung des Kernbereichs des Filaments wurden atomare Modelle des N-terminalen Bereichs des Iho670-Monomers rechnergestützt in die cryo-TEM-Rekonstruktion eingefügt (Trachtenberg *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006).

III Ergebnisse

1 Aufreinigung der Zellanhänge

1.1 Analyse der Fraktionen des CsCl-Gradienten

Um Zellanhänge von *I. hospitalis* selektiv anzureichern, wurde der Fermentationsüberstand einer PEG/NaCl-Fällung unterzogen. Das dabei entstandene Präzipitat wurde über eine bzw. mehrere Dichtegradienten-Zentrifugationen aufgetrennt, die entstandenen Banden gezapft und einzeln analysiert.

Im Verlauf der isopyknischen Ultrazentrifugation mit CsCl kam es dabei stets zur Ausbildung von zwei farbigen Banden, wobei die untere, weiße Fraktion in elektronenmikroskopischen Analysen klar Filamente in aufkonzentrierter Form erkennen ließ (vgl. Abb. III.1).

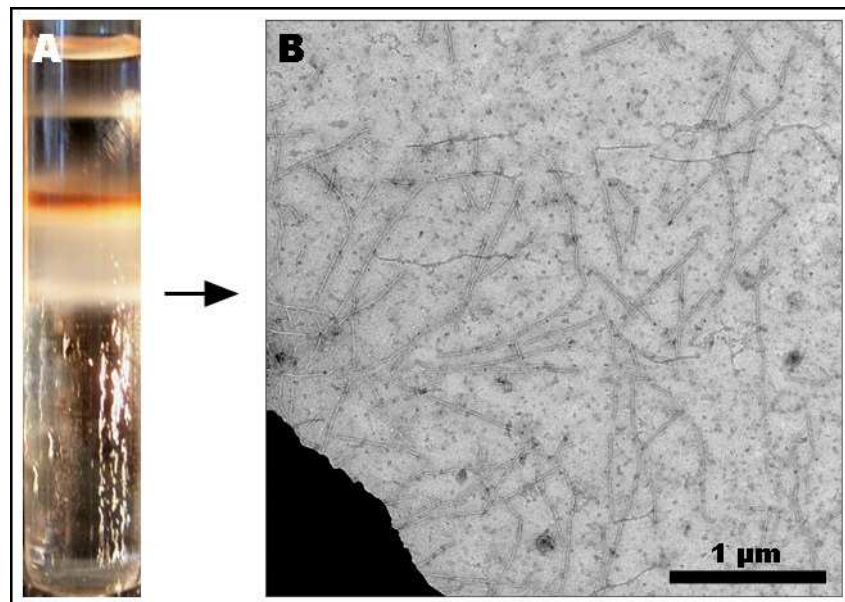


Abb. III.1: A: UZ-Röhrchen nach einer CsCl-Dichtegradientenzentrifugation von PEG/NaCl-gefälltem Fermentationsüberstand 2; B: elektronenmikroskopische Darstellung von Filamenten innerhalb der weißen Fraktion, Negativkontrastierung

Die Filamente wiesen bei der elektronenmikroskopischen Analyse eine variable Länge von 100 nm bis 3,5 µm auf, zeigten einen Durchmesser von 14 nm sowie eine deutliche Längs- und Querstreifung. Zudem waren in Fourier-Spektren Layer-Lines mit Frequenzen von $(4,2 \text{ nm})^{-1}$ feststellbar, was charakteristisch für die Fibers von *I. hospitalis* ist. Gut kontrastierte Fibers ließen zudem Layer-Lines mit Frequenzen von $(3,8 \text{ nm})^{-1}$ sowie $(3,4 \text{ nm})^{-1}$ erkennen. Nach der ersten CsCl-Gradientenzentrifugation waren noch zahlreiche Verschmutzungen in Form von diversen Proteinpartikeln zu identifizieren, welche allerdings in einer oder zwei weiteren CsCl-Gradientenzentrifugationen weitgehend abgetrennt werden konnten. Nach

einer Dialyse gegen MES-Dialysepuffer zeigten saubere Filament-Fractionen in SDS-PAGEs ein Hauptprotein von 33 kDa (vgl. Abb. III.2), welches als Hauptbestandteil des Filaments der Fibers anzusehen ist (Müller *et al.*, 2009).

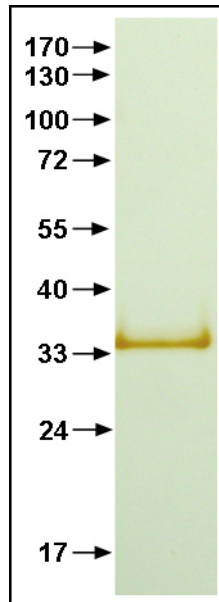


Abb. III.2: SDS-PAGE (10 % AA) von aufgereinigten, dialysierten Fibers von *I. hospitalis*, aufgetragenes Protein ca. 0,5 µg, Silberfärbung; links: Proteinmassenstandard in kDa

Eine genauere Analyse der oberen, roten Fraktion des CsCl-Gradienten zeigte bei der elektronenmikroskopischen Betrachtung ebenfalls Filamente, die jedoch in deutlich geringerer Konzentration als in der weißen Bande vorlagen. Der Durchmesser von 14 nm sowie charakteristische Fourier-Reflexe mit Frequenzen von $(4,2 \text{ nm})^{-1}$ ließen auch hier eine klare Zuordnung der Filamente zu den Fibers von *I. hospitalis* zu. Als Hauptbestandteil der roten Fraktion konnten Membranpartikel verschiedener Größe und Form identifiziert werden, welche neben unterschiedlichen, kleineren Proteinen bzw. Proteinkomplexen vorlagen (vgl. Abb. III.3 A). Eine genaue Zuordnung der Membranvesikel konnte nicht getroffen werden, jedoch wiesen viele Membranstrukturen 2 nm große Poren auf, was eine Zuordnung zur äußeren Membran von *I. hospitalis* erlaubte (Burghardt *et al.*, 2007).

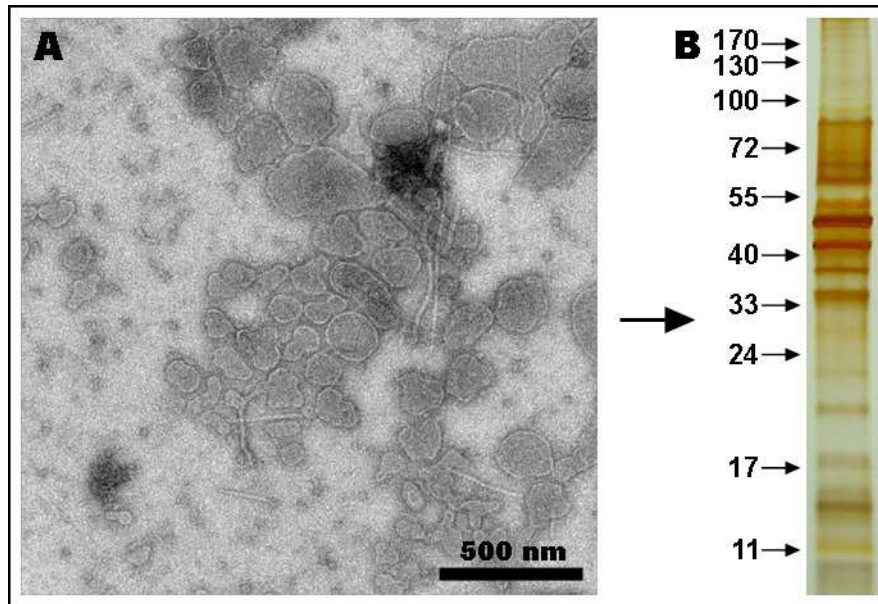


Abb. III.3: A: elektronenmikroskopische Darstellung der roten Fraktion des CsCl-Gradienten nach isopyknischer Zentrifugation, Negativkontrastierung; B: SDS-PAGE (10 % AA) der dialysierten, roten Fraktion des CsCl-Gradienten, aufgetragenes Protein ca. 1 μ g, Silberfärbung; links: Proteinmassenstandard in kDa

Eine gelelektrophoretische Analyse dieser Fraktion ergab eine Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen, was bereits elektronenmikroskopisch festgestellt werden konnte (vgl. Abb. III.3). Eine genauere Zuordnung der Proteine wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht getroffen. Zudem weisen die dominanten Banden bei 45 und 50 kDa auf ein massives Vorkommen der äußeren Membran hin. Die nur relativ schwach ausgeprägte Bande bei ca. 33 kDa indiziert daneben ein geringes Vorkommen des Fiberproteins Iho670, was ebenfalls bereits durch elektronenmikroskopische Analysen beobachtet werden konnte.

1.2 Fiber-assoziierte Strukturen der roten Fraktion des CsCl-Gradienten

Zeichnete sich die rote Fraktion zwar nur durch eine geringe Konzentration an Fibers aus, konnten in ihr eine Vielzahl von interessanten Strukturen beobachtet werden, die im Hinblick auf eine Verankerung oder Stabilisierung dieser Zellanhänge eine Rolle spielen könnten. In Abb. III.4 sind einige dieser Strukturen genauer dargestellt:

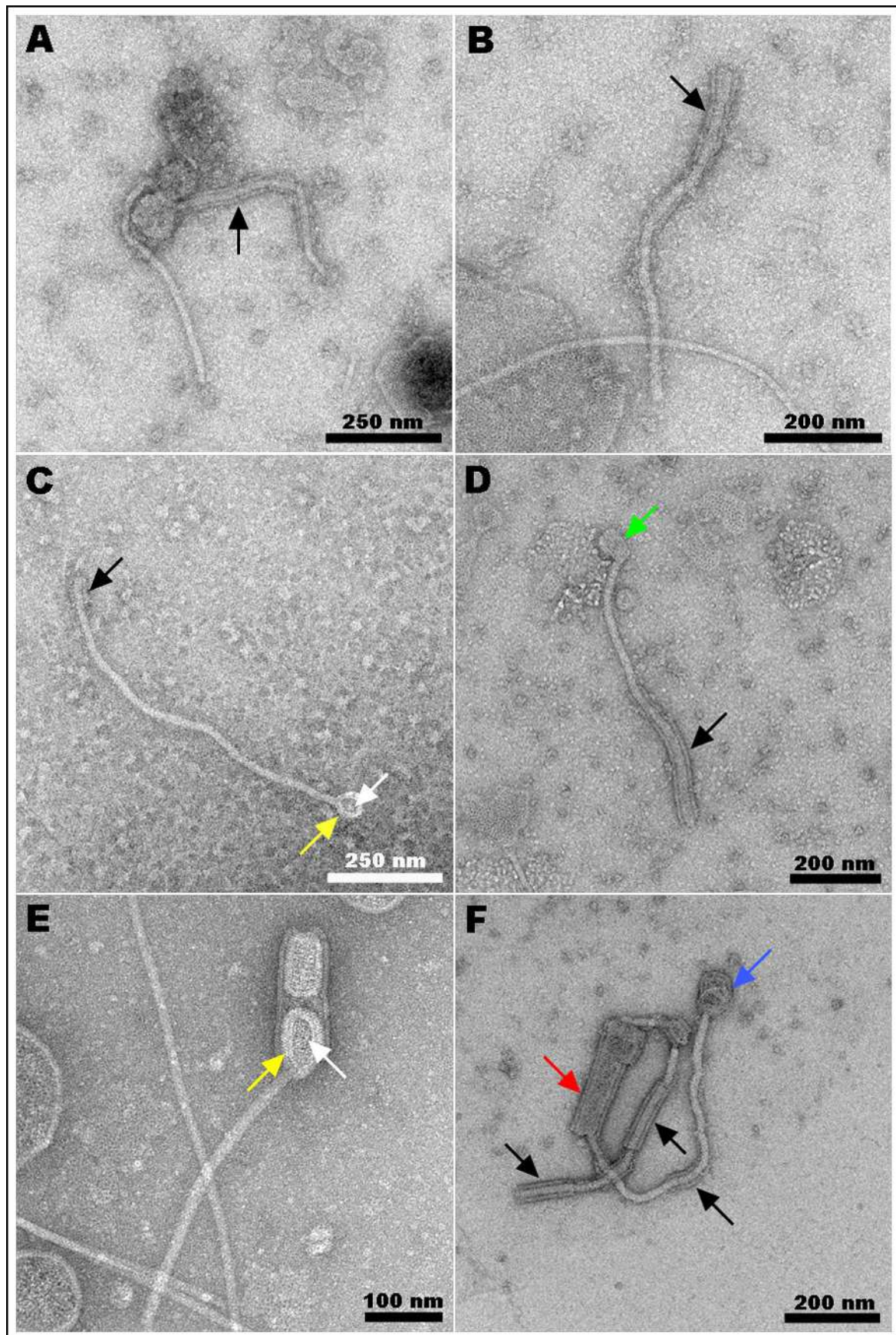


Abb. III.4: elektronenmikroskopische Darstellung von Fiber-assoziierten Strukturen, die bei der Analyse der roten Fraktionen verschiedener CsCl-Gradienten beobachtet werden konnten; alles Negativkontrastierungen, genauere Erläuterungen siehe Text

Alle oben gezeigten elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen Strukturen, die in Zusammenhang mit den Fiberfilamenten von *I. hospitalis* beobachtet werden konnten. Mit Hilfe der Funktion Linescan, welche Bestandteil des Programms EM-Menü 4 (TVIPS, Gauting) ist, konnten die einzelnen Bestandteile dieser Strukturen genau vermessen werden. So ergab sich für das Fiberfilament in allen Aufnahmen ein konstanter Wert von 14–15 nm, egal ob das Filament frei vorlag, oder ob es wie in Abb. III.4 A, B, C, D und F gezeigt, von einer bisher unbekannten Proteinstruktur umhüllt war. In Folgendem sollen nun die hier dargestellten Strukturen näher charakterisiert werden.

Die auffälligsten und am häufigsten zu beobachtenden Strukturen, die mit den Fibers assoziiert waren, stellten Proteinscheiden dar, die das Fiber-Filament umhüllten (siehe Abb. III.4 A, B, C, D und F, schwarze Pfeile). Diese Strukturen konnten dabei nie als Einzelstrukturen, sondern nur in Verbindung mit Fibers beobachtet werden und besaßen einen Gesamtdurchmesser von 38–40 nm (incl. Fiber), wobei ein lateraler Strang einen Durchmesser von ca. 11 nm einnahm. Bei der Analyse einer Vielzahl von Aufnahmen, die die Fibers in Assoziation mit derartigen Strukturen aufwiesen, wurde im Vergleich mit Aufnahmen von nichtumhüllten Fibers oft der Eindruck von größerer Flexibilität vermittelt, wenn die Fibers in umhüllter Form vorlagen. So nahmen die nichtumhüllten Fibers in den meisten Fällen eine regelmäßige und gerade Verlaufsform ein; bei den Fibers, die mit den eben beschriebenen Proteinstrukturen in Verbindung standen, waren hingegen oft Krümmungen und gewundene Abschnitte zu verzeichnen (vgl. Abb. III.4 F). Bezüglich der Länge, die diese umhüllende, ‚röhrenartige‘ Struktur einnimmt, konnte kein konstanter Wert ermittelt werden. So wurden einerseits nur sehr kurze Bereiche, von ca. 40 nm Länge beobachtet, andererseits wurden Bereiche vermessen, in denen mehr als 1 µm der Fiber mit dieser Proteinstruktur in Verbindung stand. Abb. III.4 F zeigt zusätzlich zu dieser Struktur ähnlich aussehende Proteinaggregate (roter Pfeil), die den soeben vorgestellten ‚röhrenartigen‘ Strukturen gleichen. Auch hier treten zwei laterale, 11 nm dicke Stränge in Erscheinung, die einen zentralen Part mit einem Durchmesser von 70 nm an der engsten Stelle, bzw. 95 nm an der weitesten Stelle, einschließen. Auch hier wird der Eindruck eines röhrenförmigen Aufbaus vermittelt, in dessen Tunnel die Fiber zu liegen scheint.

In einigen Fällen konnte beobachtet werden, dass das Filament der Fiber in runden bis ovalförmigen Strukturen endete bzw. von diesen ausging, welche in der Mitte einen zentralen Part (Abb. III.4 C und E, weiße Pfeile) besaßen, der eine andere Kontrastierung aufwies als dessen Umhüllung (Abb. III.4 C und E; gelbe Pfeile). Dabei konnte für den zentralen Part ein Radius von 26–30 nm ermittelt werden, für die umhüllende Struktur wurde jeweils ein Durchmesser von 14–15 nm bestimmt. Diese, den zentralen Part umhüllende Struktur wies stets die gleiche Kontrastierung und den gleichen Durchmesser auf wie das davon ausgehende Filament. Jedoch konnte an dieser Stelle nicht geklärt werden, ob es sich hier

um eine Fortsetzung der Fiber bzw. um Strukturen des Fiberproteins Iho670 handelt, oder ob die Umhüllung von einer bzw. mehreren bisher unbekannten Proteinspezies gebildet wird. Auch in Abb. III.4 F mündet die Fiber in einen ovalförmigen Bereich, der den zuvor beschriebenen Strukturen ähnelt (blauer Pfeil). Allerdings weist dieser Bereich eine weniger klare Strukturierung auf als die in Abb. III.4 C und E dargestellten Bereiche, was auf einen möglichen Kollaps dieser Struktur hindeutet.

Abb. III.4 D zeigt ebenfalls eine unregelmäßig geformte Struktur, in welche die Fiber zu münden scheint (grüner Pfeil). Bei genauerer Betrachtung weist diese Struktur kleine, schwarz erscheinende Poren auf, welche ebenfalls in einigen in der Umgebung liegenden Membranpartikeln zu erkennen sind. Eine zweifelsfreie Klärung der Frage, ob es sich hierbei wirklich um eine Membranstruktur handelt, bzw. zu welcher Art von Membran diese Struktur zuzuordnen ist, war an dieser Stelle nicht möglich.

1.3 N-terminale Sequenzierung des Filamentproteins von *I. pacificus*

Bereits in früheren Arbeiten wurde versucht, die Filamente von *I. pacificus* näher zu analysieren (Meyer, 2007), um Vergleiche mit den Fibers von *I. hospitalis* anstellen zu können. Die N-terminale Sequenzierung wurde damals an einer aufgereinigten Fraktion durchgeführt, die nahezu ausschließlich das 39 kDa große Hauptprotein der *I. pacificus*-Filamente enthielt. Das Ergebnis dieser Sequenzierung ergab 16 Aminosäuren, die mit der N-terminalen Sequenz des aufgereinigten *I. hospitalis*-Fiberproteins übereinstimmten (Müller *et al.*, 2009). Allerdings waren für alle Positionen noch weitere Aminosäuren möglich, so dass keine eindeutige Zuordnung der N-terminalen Sequenz des Filamentproteins von *I. pacificus* getroffen werden konnte. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden nun verschiedene Filamentfraktionen von *I. pacificus* vereinigt und erneut aufgereinigt (vgl. Kap. II.5). Nach SDS-PAGE und Western Blot konnte die Bande bei 39 kDa mit Coomassie angefärbt und somit einer N-terminalen Sequenzierung über Edman-Abbau unterzogen werden. Das Ergebnis VSPVIXTLLLLILIXVX (X: nicht identifizierbare AS) bestätigte dabei die bereits in Meyer, 2007 vermutete Sequenz und zeigte, dass der N-Terminus des *I. pacificus*-Filamentproteins mit dem des Fiberproteins Iho670 von *I. hospitalis* übereinstimmt. Aufgrund von fehlenden Genomsequenzdaten von *I. pacificus* kann hier allerdings keine Aussage über die weitere Proteinsequenz des Filamentproteins von *I. pacificus* getroffen werden.

2 Immunologische Untersuchungen

Wie unter Kap. III.1.1 beschrieben, konnten im Verlauf der Aufreinigung Fraktionen erhalten werden, die Fibers in konzentrierter und aufgereinigter Form enthielten. Diese zeigten in SDS-PAGEs ein dominierendes Protein mit einer relativen molekularen Masse von 33 kDa, welches das Hauptprotein der Fibers von *I. hospitalis* darstellt (Müller *et al.*, 2009). Gegen dieses Protein lagen bereits in Kaninchen generierte, polyklonale Antikörper vor, welche von der Arbeitsgruppe Wirth für diverse Versuche bereitgestellt wurden. Die Bindungsaffinität dieses rabbit anti-Iho670 Antikörpers wurde nun in verschiedenen Versuchen getestet.

2.1 Immunmarkierung mittels Western Blot

Zum Test der Spezifität des Antikörpers rabbit anti-Iho670 wurden Fraktionen eingesetzt, die im Verlauf der Aufreinigung über CsCl-Gradientenzentrifugation erhalten, dialysiert und im Vorfeld elektronenmikroskopisch als auch gelelektrophoretisch untersucht wurden. Dabei wurden Fraktionen der roten Bande des CsCl-Gradienten gewählt, die sich elektronenmikroskopisch durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen auszeichneten, die neben den Fibers vorlagen. Zudem zeigten diese Fraktionen in SDS-PAGEs ein komplexes Bandenmuster, was ebenso für eine starke Verunreinigung der Fibers durch weitere Proteine spricht.

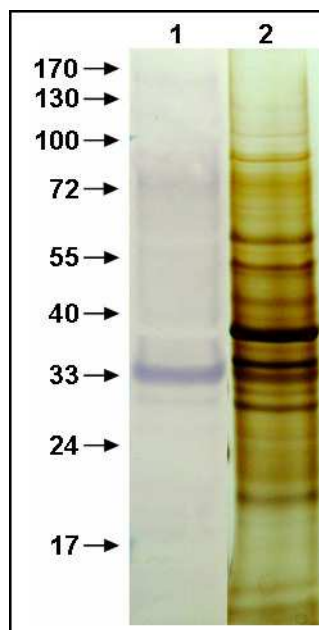


Abb. III.5: Spur 1: Western Blot, eingesetztes Protein ca. 1 µg, primärer Antikörper rabbit anti-Iho670 1:500.000, sekundärer Antikörper goat anti-rabbit IgG + alkalische Phosphatase 1:25.000; Spur 2: SDS-PAGE (10 % AA) der dem Western Blot entsprechenden Fraktion, eingesetztes Protein ca. 1 µg, Silberfärbung; links: Proteinmassenstandard in kDa

In Abb. III.5 ist zu erkennen, dass der rabbit anti-Iho670 Antikörper spezifisch eine Bande bei 33 kDa detektiert. Eine eindeutige Anfärbung von anderen Banden ist nicht zu erkennen, wenngleich im Bereich von 35 – 100 kDa Signale in Form eines Schmiere auftreten. In mehreren Fällen konnten zusätzlich schwache Signale bei ca. 65, 100 und 130 kDa detektiert werden (Daten nicht gezeigt), welche stets neben einer klar markierten Bande bei 33 kDa vorlagen. Ein Test des Präimmunserums zeigte in keiner der getesteten Verdünnungen eine spezifische, positive Reaktion.

2.2 Immunmarkierung von Fibers in Lösung

Nachdem über Western Blot Analysen die Spezifität des Antikörpers nachgewiesen werden konnte, wurde eine Immunmarkierung der Fibers in Lösung angestrebt, um Aufschluss über die Verteilung des Iho670-Proteins in den Fibers zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden Aliquots der weißen Fraktionen, die bei der Aufreinigung der Fibers nach der CsCl-Gradientenzentrifugation erhalten wurden, in dialysierter Form eingesetzt und nach der Markierung elektronenmikroskopisch untersucht.

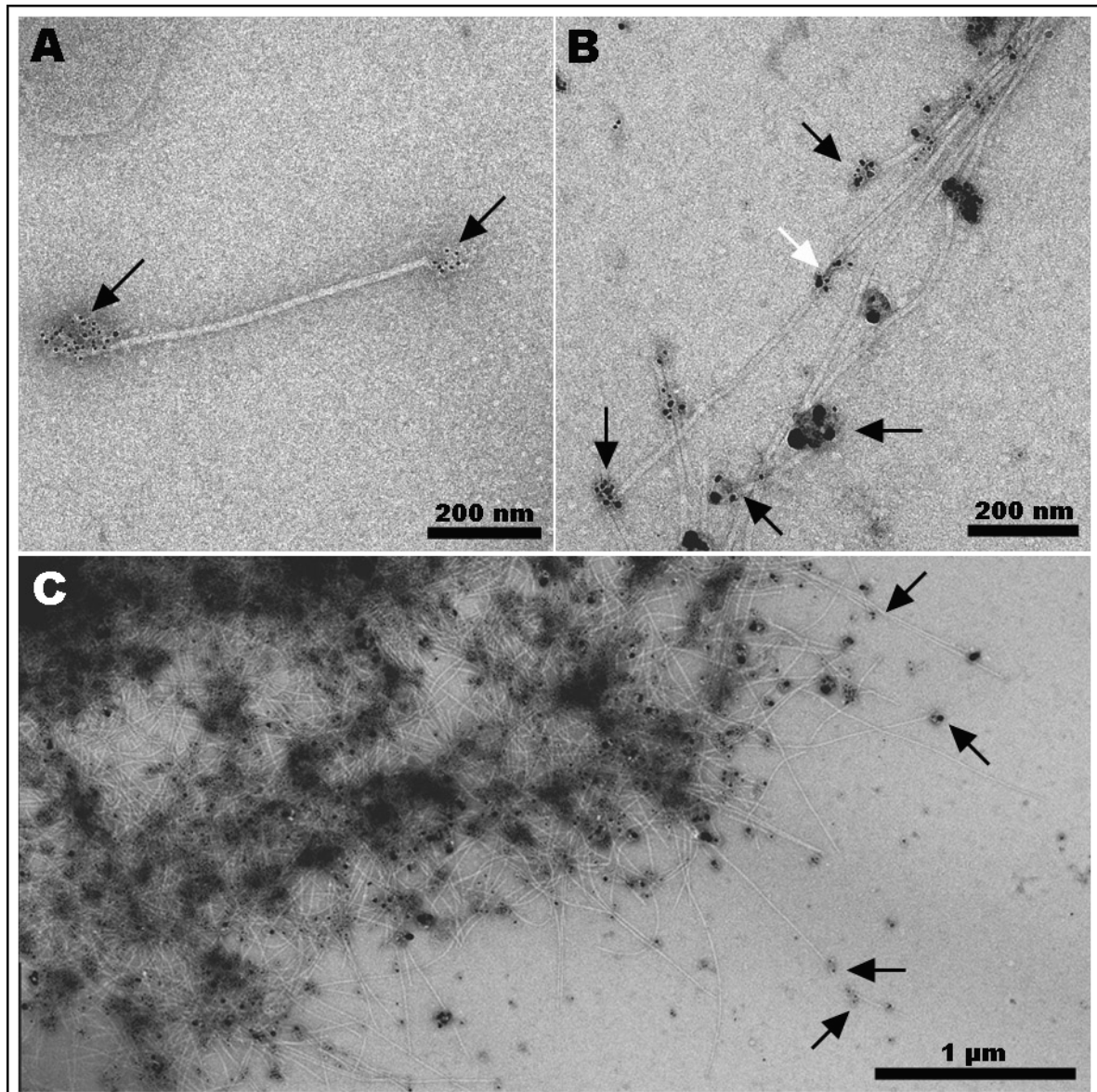


Abb. III.6: Immunmarkierung von Fibers von *I. hospitalis* in Lösung, A: prim. Antikörper rabbit anti-Iho670 1:10, sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + 6 nm Gold 1:5, Negativkontrastierung; B und C: prim. Antikörper rabbit anti-Iho670 1:10, sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + ultra small Gold 1:5, Silberverstärkung 6 Min.; Negativkontrastierungen, genauere Erläuterungen siehe Text

Wie in Abb. III.6 gezeigt, findet eine Markierung der Fibers von *I. hospitalis* mit dem rabbit anti-Iho670 Antikörper statt. Dabei war es unerheblich, ob der sekundäre Antikörper an 6 nm Goldpartikel oder an ultra-small Goldpartikel gekoppelt vorlag. Auffällig ist, dass sich die Markierungen zum großen Teil an den Anfangs- bzw. Endpunkten der Fibers befinden, welche dort in gehäufte Form detektiert werden können (Abb. III.6 A - C, schwarze Pfeile). Signale über die gesamte Länge des Filaments waren zwar zu beobachten, jedoch stellten diese im Vergleich mit der Markierung der Anfangs- bzw. Endstrukturen nur einen geringen Teil dar (vgl. Abb. III.6 B, weißer Pfeil). Waren auf dem Grid Stellen, an welchen sich Fibers in hoher Konzentration befanden, fand eine sehr effiziente Antikörpermarkierung statt (siehe Abb. III.6 C). Ein Vorteil dieser Immunmarkierungsmethode in Lösung war das Vorhanden-

sein von internen Kontrollen, welche in Form von verschiedenen Proteinen bzw. Proteinaggregaten vorlagen. Diese als Verschmutzungen anzusehenden Strukturen zeigten keine Bindungsaffinität zu dem rabbit anti-Iho670 Antikörper und sprechen klar für eine spezifische Immunmarkierung des Antikörpers.

Trotz zahlreicher Optimierungsversuche war es mit dieser Methode nicht möglich, eine spezifische Antikörpermarkierung über die gesamte Länge des Fiberfilaments zu erreichen, was wohl darauf zurückzuführen ist, dass es sich bei den Epitopen, welche der rabbit anti-Iho670 Antikörper erkennt, um Strukturen handelt, die sich größtenteils innerhalb des Filaments befinden und nicht auf dessen Oberfläche exprimiert vorliegen. Genauere Analysen zum Bindungsverhalten des rabbit anti-Iho670 Antikörpers werden in der Diskussion erläutert.

2.3 Immunmarkierung auf bewachsenen Goldgrids

Wie bereits in der Diplomarbeit von Daniel Müller (2005) gezeigt, ist es möglich, *Ignicoccus*-Zellen direkt auf kohlebeschichteten Goldträgern für die Elektronenmikroskopie zu kultivieren. Dies ermöglicht eine sehr schonende Art die Fibers von *I. hospitalis* darzustellen, da Zentrifugationsschritte und dadurch auftretende Scherkräfte vermieden werden und die Fibers weitestgehend unbeschädigt erhalten bleiben. Zum anderen ist zu beobachten, dass die Zellen unter diesen Bedingungen sehr viel mehr Fibers exprimieren als planktonisch wachsende Zellen. Um diese Vorteile zu nutzen, wurden mit *I. hospitalis* bewachsene Goldgrids für Immunmarkierungsexperimente verwendet. Die Ergebnisse dieser Markierungen sind in Abb. III.7 dargestellt:

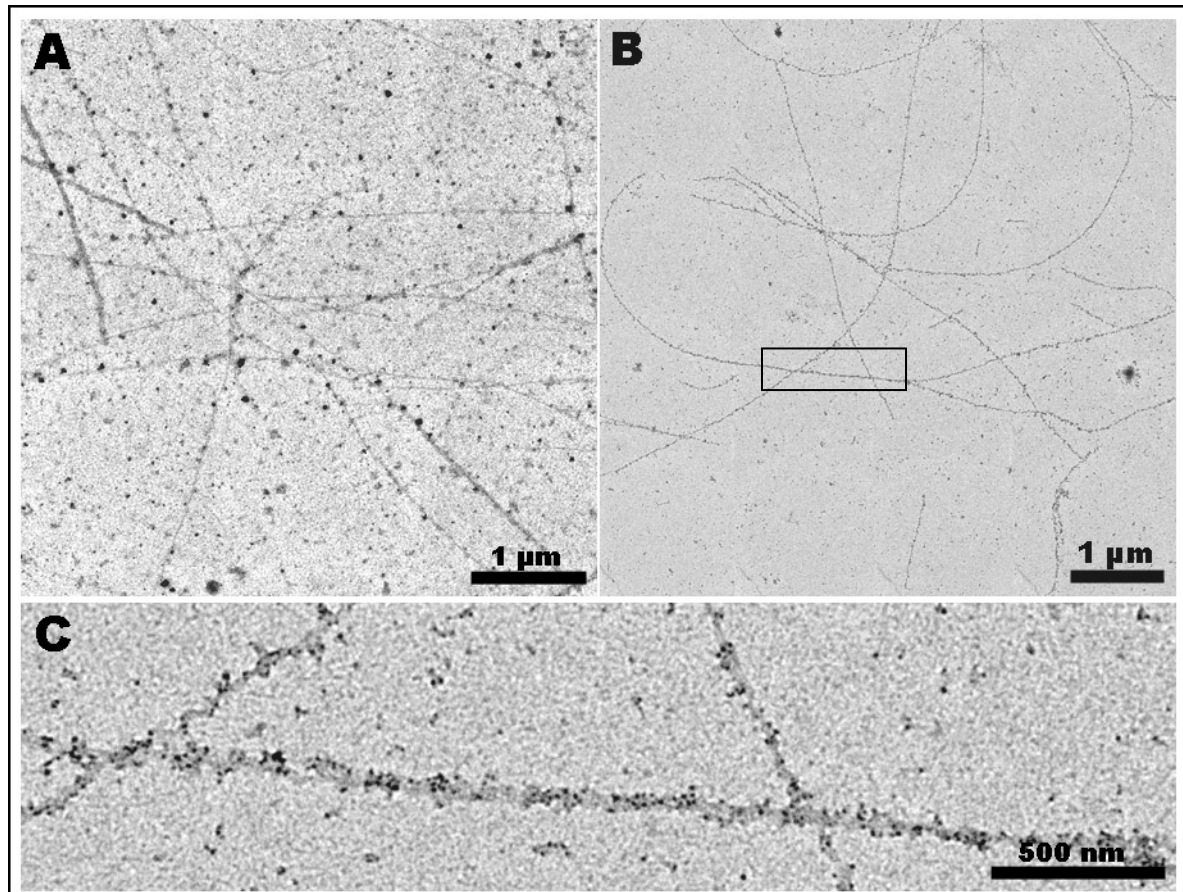


Abb. III.7: Immunmarkierung von Fibers auf kohlebeschichteten Goldgrids; A: prim. Antikörper rabbit anti-Iho670 1:100, sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + ultra small Gold 1:50 incl. Silberverstärkung (6 Min.); B: incl. Hitzeschritt, prim. Antikörper rabbit anti-Iho670 1:10, sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + 6 nm Gold 1:5; C: vergrößerter Ausschnitt des in B umrandeten Bereichs; alles Negativkontrastierungen

Wurde die Immunmarkierung wie unter Kap. II.13.4 beschrieben ohne einen vorherigen Hitzeschritt durchgeführt, konnten ungleichmäßig verteilte Signale über die gesamte Länge der Fibers detektiert werden. Allerdings war in allen Versuchen, in denen die Grids keiner Hitzebehandlung unterzogen wurden, eine hohe Hintergrundverschmutzung sowie eine geringe Zelldichte zu verzeichnen. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den verwendeten Sekundärantikörpern goat anti-rabbit IgGs, gekoppelt an ultra-small Gold bzw. goat anti-rabbit IgGs, gekoppelt an 6 nm Goldpartikel (vgl. Kap. III.2.2).

Eine deutliche Signalverbesserung konnte durch eine partielle Hitzedenaturierung im Vorfeld der Immunmarkierung erzielt werden, bei welcher die Grids für ca. 20 Minuten bei trockener Hitze inkubiert wurden. Wie in Abb. III.7 B gezeigt, wurde durch diesen Schritt die Hintergrundverschmutzung drastisch reduziert und die Fibers über die gesamte Länge der Filamente gleichmäßig markiert.

Als weiterer Vorteil des Hitzeschritts stellte sich vor allem der Erhalt der Zellen heraus (siehe Abb. III.8), die durch diese modifizierte Art der klassischen Hitzefixierung weiterhin nachweisbar blieben. Waren in den Immunmarkierungsexperimenten ohne initialen Hitze-

schrift nur noch sehr wenige Zellen zu verzeichnen, konnten auf hitzefixierten Goldgrids noch zahlreiche Zellen mit von ihnen ausgehenden Fibers dokumentiert werden. Dies ermöglichte eine relativ sichere Zuordnung der Fibers zu bestimmten Zellen. Im Regelfall konnten mit dieser Methode 4-12 Fibers pro *Ignicoccus*-Zelle detektiert werden, welche peritrich von der Zelle ausgingen. Zudem konnten Signale des sekundären Antikörpers auf der Oberfläche der *Ignicoccus*-Zellen detektiert werden.

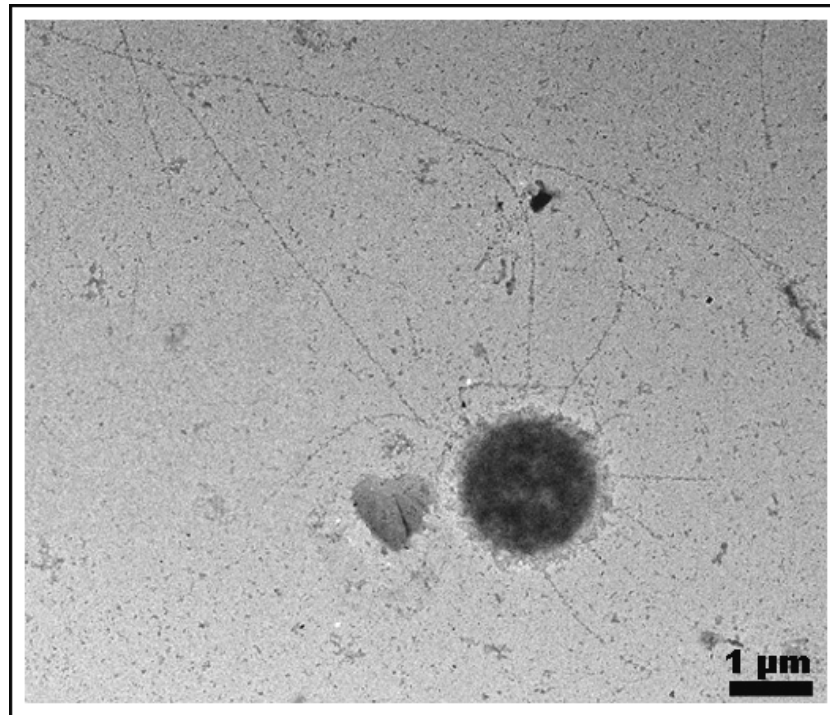


Abb. III.8: Immunmarkierung einer auf Goldgrids kultivierten *I. hospitalis*-Zelle nach Hitzeschritt, prim. Antikörper rabbit anti-Iho670 1:10, sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + 6 nm Gold 1:5, Negativkontrastierung

2.4 Ablöseversuche

Nachdem bereits im Zuge von Immunmarkierungsexperimenten auf bewachsenen, kohlebeschichteten Goldgrids für die Elektronenmikroskopie beobachtet werden konnte, dass sich auf nicht hitzefixierten Grids Zellen von *I. hospitalis* ablösten, sollte dies im Zuge von Ablöseversuchen näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden bewachsene Goldgrids in einer Verdünnung des Iho670-Antikörpers geschwenkt und im Anschluss elektronenmikroskopisch untersucht. Als Kontrollen wurden die Grids sowohl in einer Lösung ohne primären Antikörper bzw. in einer Verdünnung des Ihomp1 Antikörpers (*I. hospitalis* outer membrane protein 1, Antikörper gerichtet gegen das dominierende Protein der äußeren Membran von *I. hospitalis*) inkubiert. Ziel war es, eine mögliche Adhäsionsfunktion des Iho670-Proteins nachzuweisen.

Bei der Auswertung der bewachsenen Grids war jedoch keine vermehrte Ablösung von Fibers oder Zellen festzustellen, wenn die Grids in einer Lösung mit dem rabbit anti-Iho670 Antikörper inkubiert wurden. Vor allem hinsichtlich der Ablösung von Fibers konnten keine Unterschiede zu den Kontrollen ohne Antikörper bzw. mit dem Iho670 Antikörper festgestellt werden; alle Grids zeigten stets eine gleichbleibend hohe Konzentration von Fibers. Eine Analyse der Ablösung der Zellen stellte sich als schwierig heraus, da die Kontrollgrid ohne primären Antikörper stets unterschiedlich stark bewachsen waren und nur schwer Vergleiche mit den anderen Ansätzen zuließen. Tendenziell zeigten jedoch alle Grids, die in den Ablöseversuchen analysiert wurden, geringere Zelldichten als jene Grids, die direkt nach der Inkubation schwermetallkontrastiert wurden, so dass das Ablösen eher auf die langen Inkubations- und Waschschrte zurückzuführen ist, als auf Ablöseeffekte durch den Iho670-Antikörper.

2.5 Immunmarkierung an Ultradünnschnitten

Mit Hilfe von Immunmarkierungen an Ultradünnschnitten sollte die subzelluläre Verteilung des Iho670-Proteins innerhalb ganzer Zellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden *Ignicoccus*-Zellen nach Kultivierung in Cellulosekapillaren hochdruckgefroren, in einer für Immunmarkierungsexperimente adäquaten Lösung gefriersubstituiert und in das Kunstharz Epon eingebettet, das eine Anfertigung von Ultradünnschnitten ermöglichte. Diese Prozedur stellt eine sehr schonende Art der Präparation dar, da Zentrifugationsschritte vermieden werden, die die Fibers von *I. hospitalis* abscheren oder beschädigen könnten. Andererseits wird eine enorm schnelle Kryofixierung im Zuge der Hochdruckgefrierung erzielt, welche eine Eiskristallbildung unterdrückt, so dass die Zellen in einer bestmöglichen Struktur, nah am nativen Zustand, verbleiben können (Studer *et al.*, 2001; Vanhecke *et al.*, 2008).

Eine Immunmarkierung von *I. hospitalis*-Zellen zeigte eindeutig Signale in der äußeren Membran, in den periplasmatischen Vesikeln und der Cytoplasmamembran (s. Abb. III.9). Das Cytoplasma selbst zeigte keine signifikante Markierung, ebenso wenig der periplasmatische Raum an sich. In Abb. III.9 A bzw. III.9 D ist zudem ein Längsschnitt durch eine Fiber zu erkennen, an welcher ebenfalls Antikörpermarkierungen festzustellen sind. Bezüglich der Markierung ist keine Präferenz für bestimmte Abschnitte in den einzelnen Strukturen festzustellen, die Markierung erstreckte sich stets regelmäßig über die gesamte Länge beider Membranen. In manchen Fällen zeigte sich eine bevorzugte Markierung der Cytoplasmamembran, welche im Gegensatz zur äußeren Membran mehr Markierungen aufwies; eine völlige Aussparung der äußeren Membran konnte allerdings nie beobachtet werden.

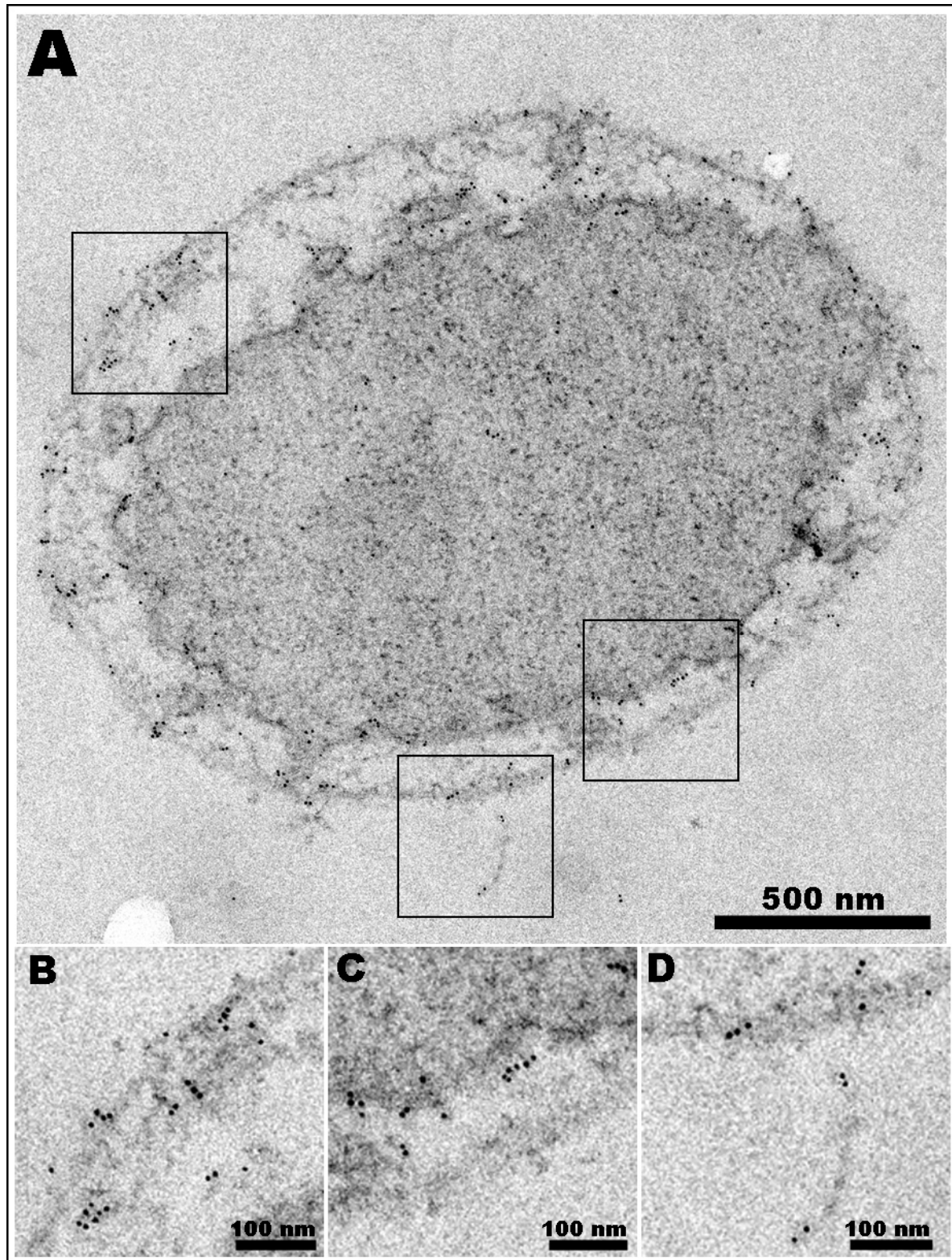


Abb. III.9: Immunmarkierung am Ultradünnschnitt einer in einer Cellulosekapillare kultivierten *I. hospitalis*-Zelle, prim. Antikörper rabbit anti-Iho670 1:100, sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + 6 nm Gold 1:50, Negativkontrastierung (incl. Kontrastverstärkung mit PbCi)

In mehreren Immunmarkierungen konnten Cluster von Antikörpern beobachtet werden, wobei diese stets im Cytoplasma, in unmittelbarer Nähe unter der Cytoplasmamembran, bzw. direkt in der Cytoplasmamembran lokalisiert werden konnten. Weder in den Kontrollen

ohne primären Antikörper, noch in den Versuchen, in denen anstatt des rabbit anti-Iho670 Antikörpers das Präimmunserum verwendet wurde, konnten spezifische Markierungen detektiert werden.

2.6 Untersuchung von Kreuzreaktionen

Im Zuge der Immunmarkierung an elektronenmikroskopischen Präparaten sollte auch eine mögliche Kreuzreaktion des rabbit anti-Iho670 Antikörpers mit Zellen bzw. Zellanhängen von *I. pacificus* und *I. islandicus*, sowie mit der Co-Kultur, bestehend aus *I. hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*, untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Immunmarkierungen an analog zu den Versuchen mit *I. hospitalis* vorbereiteten Präparaten dieser Organismen durchgeführt. Einerseits wurden hochdruckgefrorene, gefriersubstituierte und in Epon eingebettete Präparate verwendet, andererseits wurden bewachsene Goldgrids für Immunmarkierungsexperimente markiert.

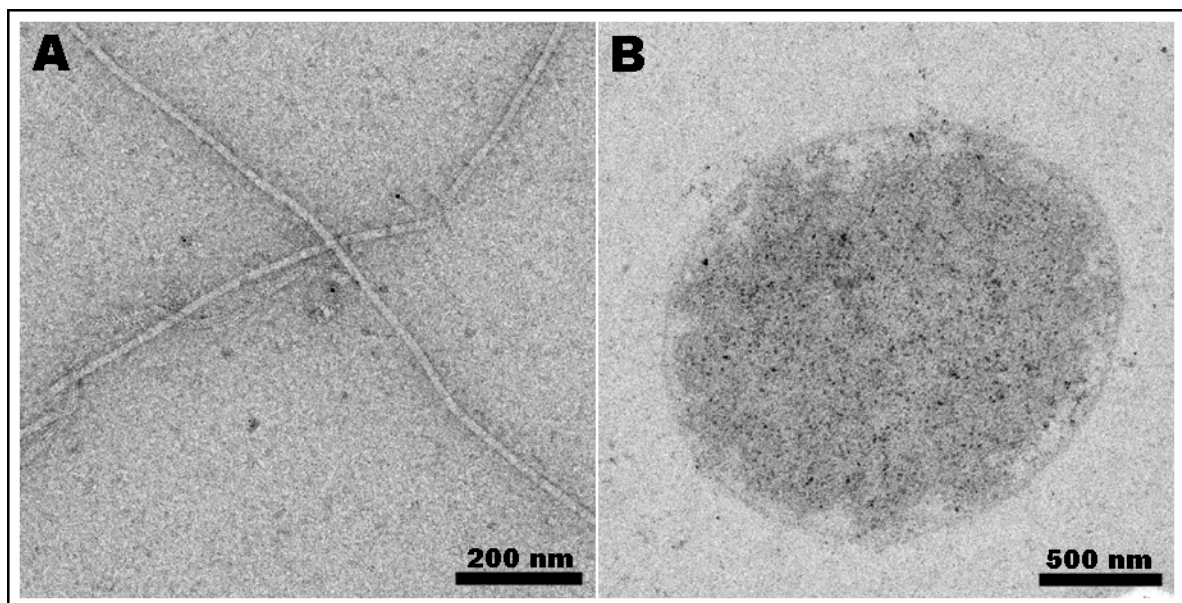


Abb. III.10: Versuche zur Kreuzreaktion; A: Immunmarkierung auf mit *I. pacificus* bewachsenen kohlebeschichteten Goldgrids, prim. Antikörper rabbit anti-Iho670 1:10, sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + 6 nm Gold 1:5, Negativkontrastierung; B: Immunmarkierung an Ultradünnschnitten von *I. islandicus*, prim. Antikörper rabbit anti-Iho670 1:100, sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + 6 nm Gold 1:50, Negativkontrastierung (incl. Kontrastverstärkung mit PbCi)

Weder an Präparaten von *I. pacificus*, noch an Präparaten von *I. islandicus* konnten elektronenmikroskopisch Signale des rabbit anti-Iho670 Antikörpers detektiert werden (siehe Abb. III.10). Dabei spielte es keine Rolle, ob für die Immunmarkierung bewachsene Goldgrids (mit oder ohne Hitzebehandlung) oder in Epon eingebettete Zellen (nach HPF und FS) verwendet wurden. Zwar sind in Abb. III.10 A 6 nm Goldpartikel zu sehen, jedoch liegen

diese nicht in Assoziation mit den Zellanhängen vor, sondern sind als Hintergrundverschmutzung anzusehen. Ebenso verhielt es sich mit den markierten Ultradünnschnitten (siehe Abb. III.10 B). Wenn an diesen Signale ausgemacht werden konnten, war keine Präferenz für bestimmte Zellabschnitte auszumachen. Des Weiteren lagen die Goldpartikel in diesen Präparaten in der gleichen Verteilung vor wie in der Zellperipherie bzw. dem restlichen Einbettungsmedium, so dass diese Signale als Hintergrundverschmutzung anzusehen waren. Eine Immunmarkierung mit dem gegen die Zellanhänge von *I. pacificus* gerichteten Antikörper rabbit anti-LPC (Meyer, 2007) diente als Positivkontrolle und zeigte die erwartete Markierung der Zellanhänge auf mit *I. pacificus* bewachsenen Goldgrids bzw. der äußeren und der cytoplasmatischen Membran von *I. pacificus* auf Ultradünnschnitten (siehe Meyer, 2007).

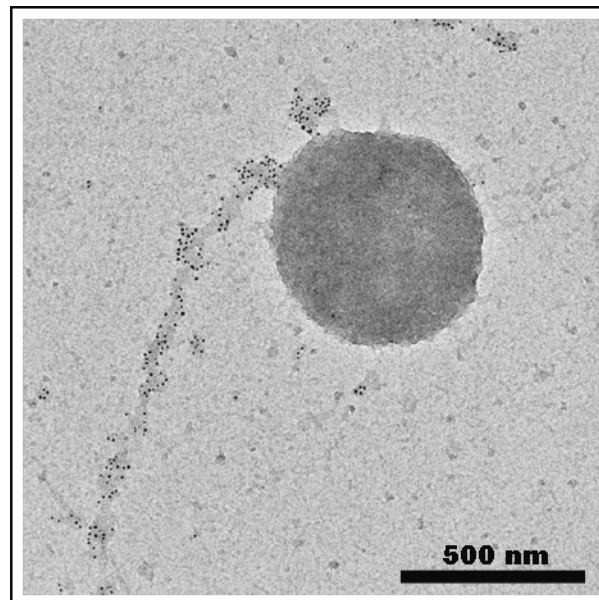


Abb.III.11: Kreuzreaktion des rabbit anti-Iho670 Antikörpers mit auf kohlebeschichteten Goldgrids kultivierten *N. equitans*-Zellen (in Co-Kultur mit *I. hospitalis*), prim. Antikörper rabbit anti-Iho670 1:10, sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + 6 nm Gold 1:5, Negativkontrastierung

Kreuzreaktionen des rabbit anti-Iho670 Antikörpers mit Präparaten der Co-Kultur aus *I. hospitalis* und *N. equitans* zeigten für *I. hospitalis* analoge Ergebnisse an, wie bereits unter Kap. III.2.3 bzw. III.2.5 für die Reinkultur Kin4/I dargestellt. *N. equitans* selbst zeigte in Ultradünnschnitten keine Markierungen, jedoch konnten in einigen Präparaten aus Aufwuchsversuchen Zellen von *N. equitans* beobachtet werden, welche Antikörpermarkierungen an von der Zelle ausgehenden Filamenten aufwiesen (siehe Abb. III.11). Somit stellt sich die Frage, ob *N. equitans* neben Lipiden (Jahn *et al.*, 2004) und anderen Metaboliten auch Bestandteile seiner Zellanhänge von *I. hospitalis* importiert. Dies wird unter Kap. IV.1.4 in der Diskussion näher behandelt.

2.7 Co-Immunpräzipitation

Innerhalb dieser Arbeit sollte die Durchführung einer Co-Immunpräzipitation (IP) der Identifizierung neuer, am Aufbau oder der Verankerung der Fiber beteiligter Proteine dienen. Zu diesem Zweck wurde eine mit Triton X-100 aufgeschlossene *I. hospitalis*-Zellsuspension mit rabbit anti-Iho670 Antikörpern versetzt und für 2 Stunden in einem Rollerdrum inkubiert. Im Zuge dieser Inkubation soll es zu spezifischen Bindungen des Antikörpers mit seinem Zielepitop kommen. Durch Zugabe von Protein A Sepharose Beads bilden sich im folgenden Inkubationsschritt Komplexe zwischen Antigen, Antikörper und den Protein A Sepharose Beads, welche leicht abzentrifugiert werden können. Liegt nun das Zielprotein Iho670 mit weiteren Proteinen assoziiert vor, kommt es automatisch auch zu einer Abzentrifugation dieser assoziierten Proteine, welche in der nachfolgenden SDS-PAGE detektiert werden können.

Den ersten Schritt der Immunpräzipitation stellte der Nachweis des Iho670-Proteins in der Überstandsfraktion des Zellaufschlusses dar, welche für die IP eingesetzt werden sollte. Dies wurde über Western Blot Analysen erfolgreich getestet (Daten nicht gezeigt).

Im Anschluss wurde die IP wie unter Kap. II.6.4 beschrieben durchgeführt und sämtliche Fraktionen mittels Western Blot und daran durchgeführter Immunlokalisation mit dem rabbit anti-Iho670 Antikörper getestet. Dabei wurden die Western Blot Analysen vor allem zur Optimierung der Bedingungen verwendet. Zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Intensität der 33 kDa Bande zwischen dem IP-Ansatz und der Negativkontrolle, bei welcher die Zellsuspension ohne rabbit anti-Iho670 Antikörper, jedoch mit Protein A Sepharose Beads inkubiert wurde, wurden diese Ansätze für SDS-PAGEs mit modifizierter Silberfärbung verwendet. Dabei war es wichtig, stets gleiche Volumina der Fraktion der Immunpräzipitation, der Negativkontrolle und der Kontrolle, in welcher nur Beads und Antikörper aufgetragen wurde, zu verwenden, um vergleichbare Ergebnisse zu garantieren. Das Ergebnis einer erfolgreichen Co-IP ist in folgender Abbildung dargestellt:

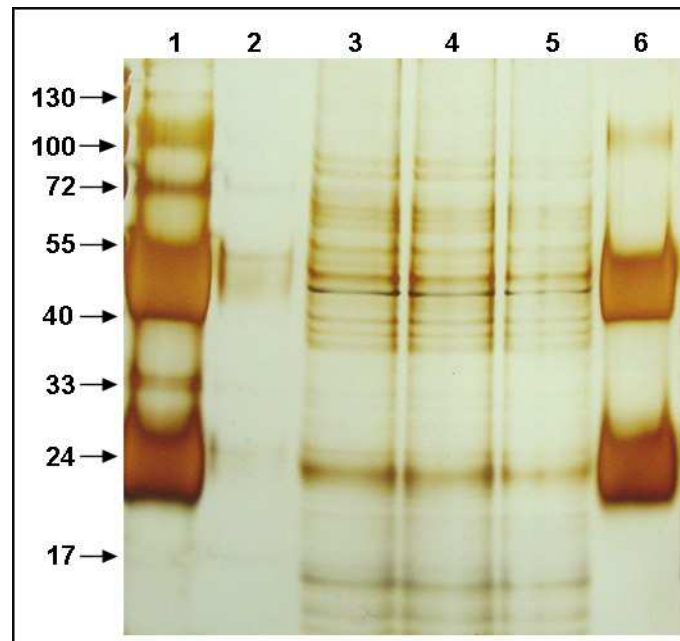


Abb. III.12: Immunpräzipitation, modifizierte Silberfärbung; Spur 1: Fraktion der IP mit rabbit anti-Iho670 Antikörper, Auftrag: 15 µl; Spur 2: Negativkontrolle zur IP, Zellsuspension ohne prim. Antikörper, jedoch mit Beads inkubiert, Auftrag: 15 µl; Spur 3: Input-Probe, Auftrag: 5 µl, Spur 4: ÜS A der IP, Auftrag: 5 µl; Spur 6: ÜS A der Negativkontrolle der IP, Auftrag: 5 µl; Spur 7: Kontrolle, nur Antikörper mit Beads inkubiert, Auftrag 15 µl, links: Proteinmassenstandard in kDa

Ein direkter Vergleich der Spur der Immunpräzipitation (Spur 1) mit der Negativkontrolle (Spur 2) sowie der Kontrolle, in welcher nur die Signale von Antikörper und Beads dargestellt sind (Spur 6), zeigt deutlich, dass es mit Hilfe der Immunpräzipitation gelang, verschiedene Proteine spezifisch zu fällen. Dabei handelt es sich um Proteine, die in den Banden bei 33 kDa, 35 kDa, 72 kDa und ca. 140 kDa mit Hilfe einer modifizierten Silberfärbung angefärbt werden konnten. In Spur 6 sind deutlich zwei dominante Proteinbanden zu erkennen, die auf die leichte (28 kDa) und die schwere Kette (52 kDa) der eingesetzten Antikörper zurückzuführen ist. Zudem taucht eine Bande bei ca. 110 kDa auf. In der Negativkontrolle der IP ist zu erkennen, dass kein Protein durch eine unspezifische Bindung an Protein Sepharose A Beads in ausreichender Menge gefällt wurde, um über eine modifizierte Silberfärbung angefärbt zu werden. Somit sind die Banden, die in der IP-Fraktion neben den Signalen der Antikörper bzw. der 110 kDa Bande detektiert werden konnten, als spezifisch gefällt anzusehen. Die Spuren 3, 4 und 5 in Abb. III.12 zeigen ein sehr ähnliches Proteinmuster. Dabei wurden in Spur 3 und 5 die Überstände der IP bzw. der Negativkontrolle aufgetragen und mit der Input Probe in Spur 4 bzw. den eigentlichen IP- oder Negativkontrollansätzen verglichen. Western Blot Analysen mit dem rabbit anti-Iho670 Antikörper ergaben dabei stets Signale bei 33 kDa in Bande 3, die in etwa der gleichen Intensität auftrat wie in Spur 1 (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass nur ca. 50% der Iho670-Proteine des IP-Ansatzes gefällt werden konnten.

Auch durch mehrere Optimierungsversuche konnte der Anteil der gefällten Iho670-Proteine nicht erhöht werden.

Zur Identifikation der über Co-IP spezifisch gefällten Proteine wurden die silbergefärbten Banden einer Sequenzierung über ESI Nano-LC MS/MS unterzogen. Im Anschluss konnten durch die ermittelten Peptidmassen bzw. Fragmentspektren und einer darauf basierenden Mascot Datenbankrecherche insgesamt 16 Proteine identifiziert werden (Dr. J. Reinders, Institut für funktionelle Genomik, Universität Regensburg). Das Ergebnis dieser Sequenzierung ist in folgender Tabelle zusammengefasst:

Tabelle III.1: Übersicht über die durch ESI Nano-LC MS/MS identifizierten Proteine der Co-Immunpräzipitation

Bande	NCBI-Accession	Protein	Mascot-Score
33 kDa	gi 156937463	hypothetical protein Igni_0670	102
35 kDa	gi 156937463	hypothetical protein Igni_0670	106
	gi 156937766	phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein	102
	gi 156937322	sulfide reductase, subunit B	89
72 kDa	gi 156938154	nickel-dependent hydrogenase, large subunit	794
	gi 156938092	V-type ATP synthase subunit A	325
	gi 156938146	multiheme cytochrome	192
	gi 156937988	solute binding protein-like protein	182
	gi 156936891	thermosome	140
	gi 156937791	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	127
	gi 156937402	V-type ATP synthase subunit I	115
140 kDa	gi 156938166	putative nitrate reductase, subunit A	424
	gi 156937388	vinylacetyl-CoA Delta-isomerase	329
	gi 156937640	hypothetical protein Igni_0847	190
	gi 156936835	adenosylhomocysteinase	154
	gi 156937746	hypothetical protein Igni_0955	88

Dabei war es möglich, den analysierten Banden mehrere Proteine zuzuordnen, was auf die hohe Sensitivität der ESI Nano-LC MS/MS Methode zurückzuführen ist, welche durch eine Kopplung von Flüssigkeitschromatographie (Nano-LC) und anschließender Tandem Massenspektrometrie (MS/MS) erzielt wird. Die jeweilige Signifikanz der Daten wird durch den Mascot-Scorewert angegeben, der die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei den identifizierten Proteinen um ein zufälliges Ereignis handelt, angibt. Dabei gilt, je niedriger der Mascot-Score, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Ereignisses. Alle in dieser Tabelle angegebenen Werte zeigen signifikante Ereignisse an.

Folgende Tabelle soll der Klärung der mutmaßlichen subzellulären Lokalisation der identifizierten Proteine in *I. hospitalis* dienen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene

Veröffentlichungen sowie das Vorhersageprogramm PSORTb (Version 3.0.1, Yu *et al.*, 2010) verwendet.

Tabelle III.2: über ESI-Nano LC MS/MS identifizierte Proteine und ihre mutmaßliche subzelluläre Lokalisation nach Podar *et al.*, 2008; Psortb und anderen Quellen (CM: Cytoplasmamembran, C: Cytoplasma, PP: Periplasma, CW: Zellwand, OM: Outer Membrane, EC: extrazellulär, UK: unknown, -: keine Angaben)

Protein	Podar <i>et al.</i> , 2008	PSORTb	andere Quellen
hypothetical protein Igni_0670	-	UK	EC (Müller <i>et al.</i> , 2009)
phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein	CM	C	-
sulfide reductase, subunit B	CM	CM	-
nickel-dependent hydrogenase, large subunit	CM	CM	CM (Burghardt, 2008)
V-type ATP synthase subunit A	-	C/CM	OM (Küper <i>et al.</i> , 2010)
multiheme cytochrome	-	UK	-
solute binding protein-like protein	CM	CW	CM/PP (Burghardt, 2008)
thermosome	-	C	C (Burghardt, 2008)
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	C	C	-
V-type ATP synthase subunit I	CM	CM	OM (Küper <i>et al.</i> , 2010)
putative nitrate reductase, subunit A	CM	C	-
vinylacetyl-CoA Delta-isomerase	C	C	-
hypothetical protein Igni_0847	-	CW	-
adenosylhomocysteinase	-	C	-
hypothetical protein Igni_0955	-	UK	-

3 Mikroskopische Analysen bewachsener Goldgrids

Im Zuge verschiedener Experimente wurden Zellen von *I. hospitalis* direkt auf kohlebeschichteten Goldgrids kultiviert. Die elektronenmikroskopische Analyse der bewachsenen Grids zeigte, dass die Zellen relativ gleichmäßig über das gesamte Grid verteilt vorlagen und dort überwiegend als Einzelzellen, jedoch auch in Paaren detektiert werden konnten. Zudem war die Existenz einer enormen Anzahl von Fibers zu beobachten, welche entweder in Verbindung mit den Zellen, oder ohne jegliche Verbindung zu Zellen von *I. hospitalis* auf der Oberfläche vorlagen (siehe Abb. III.13 A). Aufgrund der hohen Konzentration der Fibers war es meist nicht möglich, einzelne Zellanhänge bestimmten Zellen zuzuordnen.

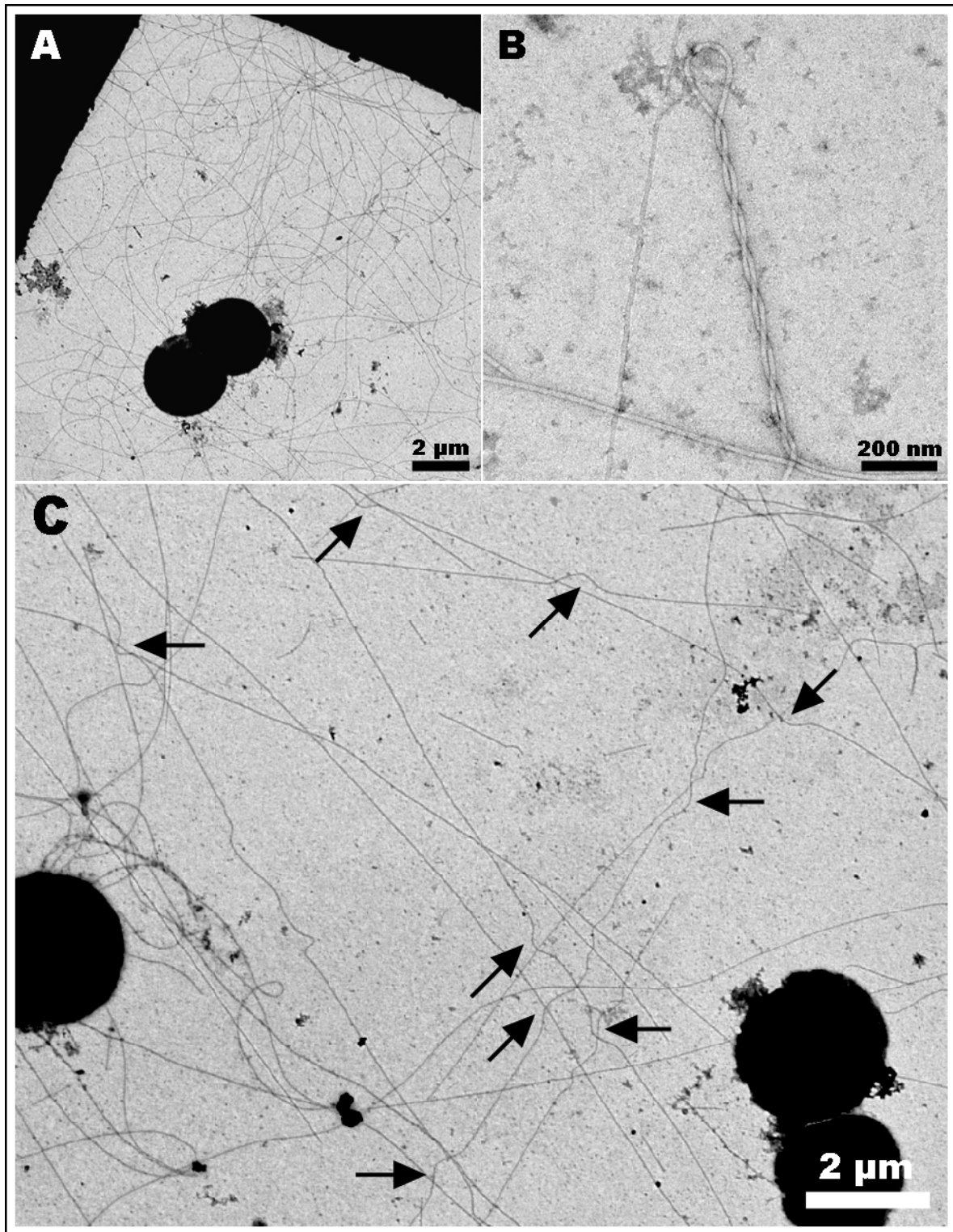


Abb. III.13: Aufnahmen von mit *I. hospitalis* bewachsenen, kohlebeschichteten Goldgrids, A: Übersichtsaufnahme; B: ‚verdrehte‘ Fibers; C: Übersichtsaufnahme mit einigen Fibers die ein ‚gewelltes‘ Erscheinungsbild zeigen, Pfeile kennzeichnen Stellen an denen sich Fibers überkreuzen; alles Negativkontrastierungen

Genauere Beobachtungen zeigten strukturelle Veränderungen der Fibers über die Länge des Filaments. Lagen die Fibers über weite Strecken (bis zu 20 µm) in gerader Form vor, zeigten sie nach diesem geraden Verlauf ein ‚gewelltes‘ Erscheinungsbild, welches an eine halbe

Sinusform erinnert (vgl. Abb. III.13 C). Dabei konnten nach einem geraden Fiberverlauf eine, jedoch auch bis zu maximal drei Wellen in Folge beobachtet werden. Im Anschluss nahmen die Fibers in vielen Fällen wieder ihre gerade Verlaufsform ein. Dabei hatten die Wellen nicht immer das gleiche Erscheinungsbild und zeichneten sich durch verschiedene Höhen und Längen, bzw. Amplituden aus. Eine Kontinuität dieser Erscheinungsform konnte jedoch nicht über weitere Strecken beobachtet werden. Vielmehr erschien es, als ob sich diese welligen Erscheinungsformen bevorzugt an solchen Stellen zeigten, an denen sich zwei Fibers überkreuzten (Abb. III.13 C, schwarze Pfeile). Allerdings konnten auch zahlreiche ‚gewellte‘ Fibers dokumentiert werden, die mit keiner anderen Struktur in Kontakt standen und frei auf der Oberfläche vorlagen.

Zudem konnten Fiberabschnitte dokumentiert werden, die in einer aufgedrehten Form erschienen, wie Abb. III.13 B zeigt. Dieses Phänomen konnte jedoch im Vergleich mit den ‚gewellten‘ Fiberformen nur sehr selten beobachtet werden. Dabei waren einzelne Fiberabschnitte bis zu 7-mal um einen anderen Abschnitt der gleichen oder einen Teil einer anderen Fiber gewunden.

Da es sich bei den Aufwuchsversuchen auf Goldgrids um eine extrem schonende und native Art der Präparation handelt und derartige Phänomene auf allen Grids beobachtet werden konnten, ist nicht von präparationsbedingten Artefakten, sondern vielmehr von einer Erscheinung mit einer biologischen Relevanz auszugehen. Theorien, die dieses Verhalten näher erörtern sollen, werden in der Diskussion behandelt.

4 Untersuchung hypothetischer Verankerungsstrukturen der Fibers

Über Verankerungsmechanismen archaeeeller Zellanhänge ist bis zum heutigen Tag nur sehr wenig bekannt. Daher sollte ein Fokus dieser Arbeit darin liegen, die Verankerungsstrukturen der Fibers von *I. hospitalis* genauer zu analysieren. Bereits in Kap. III.1.2 wurden Strukturen, die über CsCl-Gradientenzentrifugation von Fermentationsüberständen erhalten wurden, vorgestellt, welche im Hinblick auf mögliche Verankerungs- bzw. Basalstrukturen der Fibers eine Rolle spielen könnten. Diese Untersuchungen wurden an bewachsenen Goldgrids fortgeführt, welche neben den oben beschriebenen Erscheinungen zudem komplexe Strukturen, von welchen die Fibers ausgingen, offenbarten.

4.1 Analyse von Fiber-assoziierten Komplexen

Eine genauere Betrachtung von mit *I. hospitalis* bewachsenen Goldgrids offenbarte bei elektronenmikroskopischer Analyse Komplexe, in welche die Fibers mündeten, bzw. von welchen die Fibers auszugehen schienen (vgl. Abb. III.14). Durch einen Durchmesser von 14 nm und dem Auftauchen von charakteristischen Reflexen mit Frequenzen bei ca. $(4 \text{ nm})^{-1}$ in den zugehörigen Fourier-Spektren konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass es sich auch wirklich um Fibers von *I. hospitalis* handelte, welche in Verbindung mit den Komplexen standen. Dabei kamen diese Komplexe in geringer Anzahl über das gesamte Goldgrid verteilt vor, wo sie meist keine Verbindung mit ganzen Zellen bzw. Zellbestandteilen zeigten. In folgender Abbildung sind einige dieser Komplexe vergrößert dargestellt:

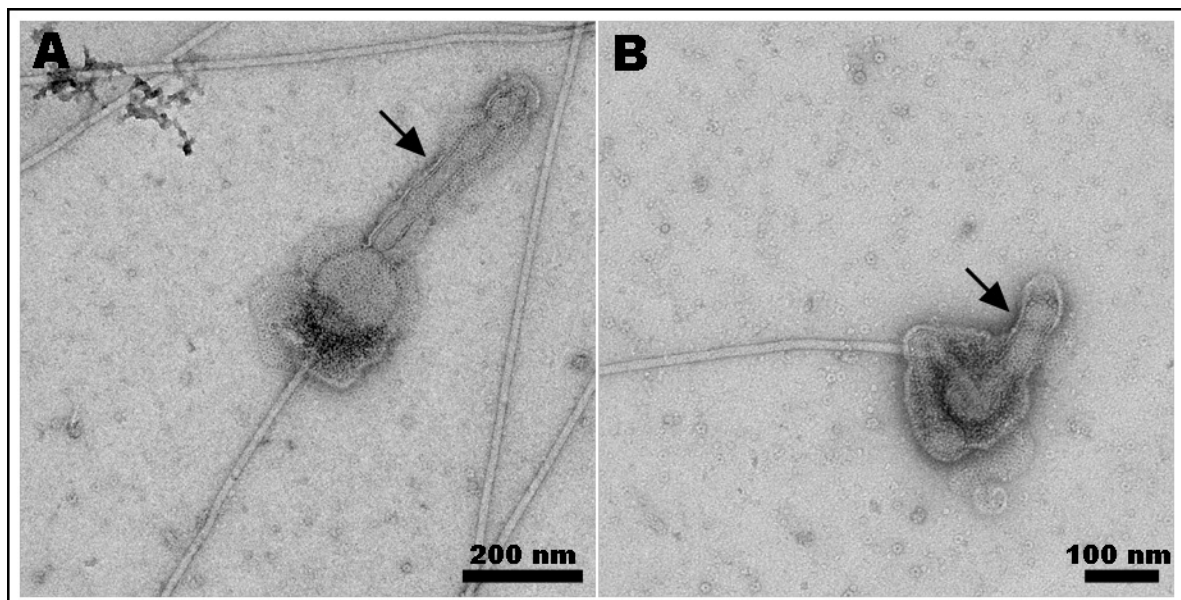


Abb. III.14: Fiber-assoziierte Komplexe auf bewachsenen, kohlebeschichteten Goldgrids; Negativkontrastierungen

Durch Inkubation der bewachsenen Goldgrids für 2 Stunden in oxischem $\frac{1}{2}$ SME-Medium (pH 6,75) konnte die Anzahl der gefundenen Komplexe erheblich erhöht werden, so dass eine genauere Analyse möglich war und die Komplexe gezielt miteinander verglichen werden konnten. Auffällig war, dass ein Großteil der analysierten Komplexe bis zu 1 μm lange Fortsätze (Abb. III.14 A und B, schwarze Pfeile) aufwiesen, die unter anderem aus mehreren verschiedenen Membranen zu bestehen schienen. Dabei erstreckten sich die Fortsätze entweder direkt aus der kugeligen, zentralen Struktur (Abb. III.14 B), oder sie waren durch eine membranartige Grenze von dieser abgetrennt (Abb. III.14 A und III.16 B).

In Bezug auf die räumliche Anordnung bzw. Verteilung konnte festgestellt werden, dass viele Komplexe frei auf dem Kohlefilm des Grids zu finden waren und keine Verbindung zu weiteren Komplexen, Zellen oder anderen Strukturen zeigten. Die Komplexe lagen meist

über das gesamte Grid verstreut als Einzelkomplexe, jedoch in wenigen Fällen in räumlicher Nähe (wenige μm Abstand zueinander), in einer Gruppe von bis zu fünf Komplexen vor (siehe Abb. III.15). Für die Länge der zugehörigen Fibers konnten keine konstanten Werte ermittelt werden; es wurden sowohl sehr kurze Fiberfragmente von weniger als $1\ \mu\text{m}$ beobachtet, als auch Fiberfilamente, welche sich über mehrere $10\ \mu\text{m}$ erstreckten.

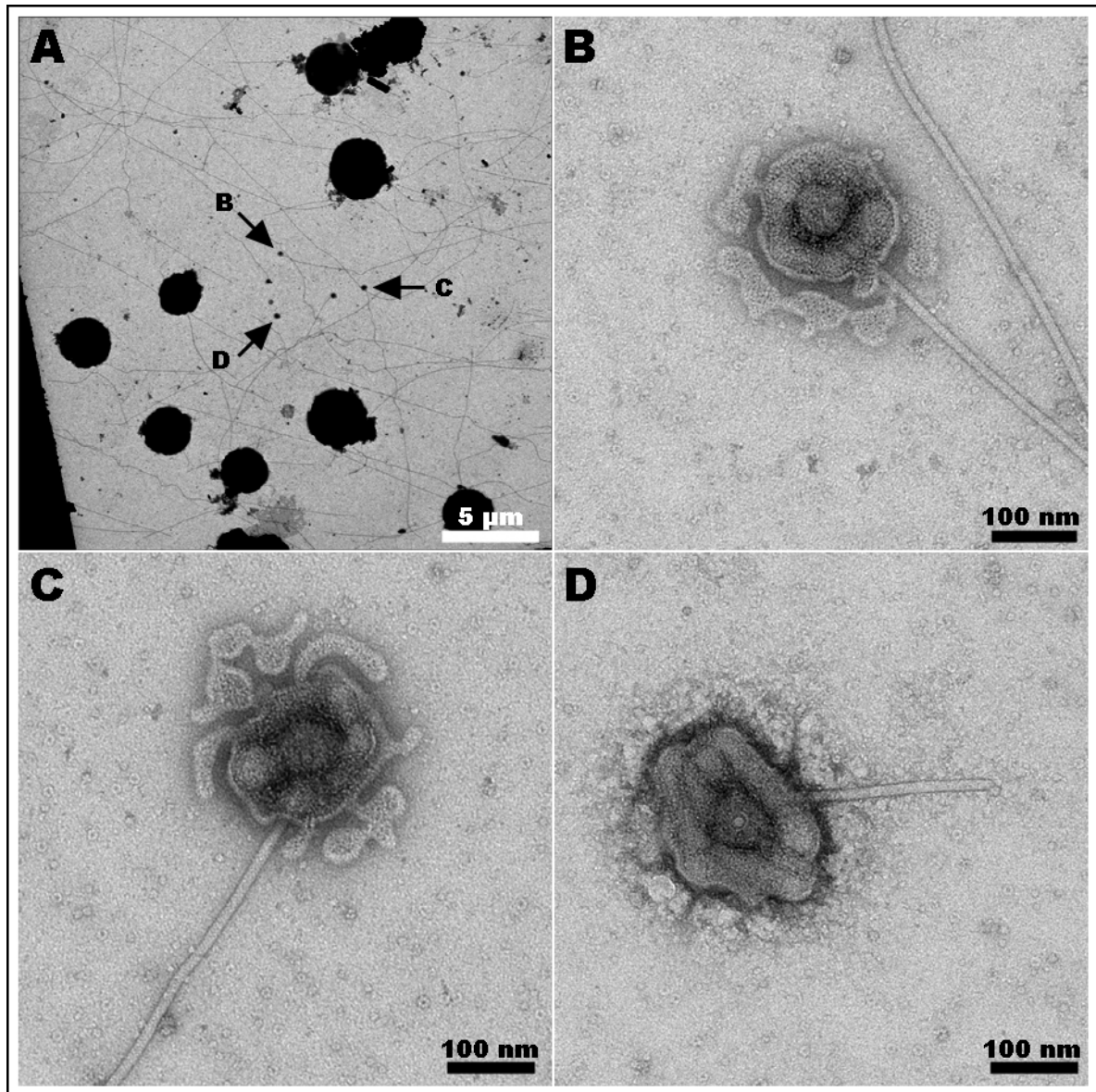


Abb. III.15: bewachsenes, kohlebeschichtetes Goldgrid nach gezielter Komplexherstellung; A: Übersichtsaufnahme mit zentraler Gruppe von Komplexen; B, C und D: Vergrößerung der unter A mit Pfeilen markierten Komplexe; Negativkontrastierung

Wie bereits erwähnt lagen die Komplexe zum größten Teil frei auf der Oberfläche vor, jedoch konnten in einigen Fällen Komplexe, welche noch in Verbindung mit teilweise lysierten Zellen von *I. hospitalis* standen, beobachtet werden (vgl. Abb. III.16). Zwei solcher Beispiele sind in Abb. III.16 dargestellt:

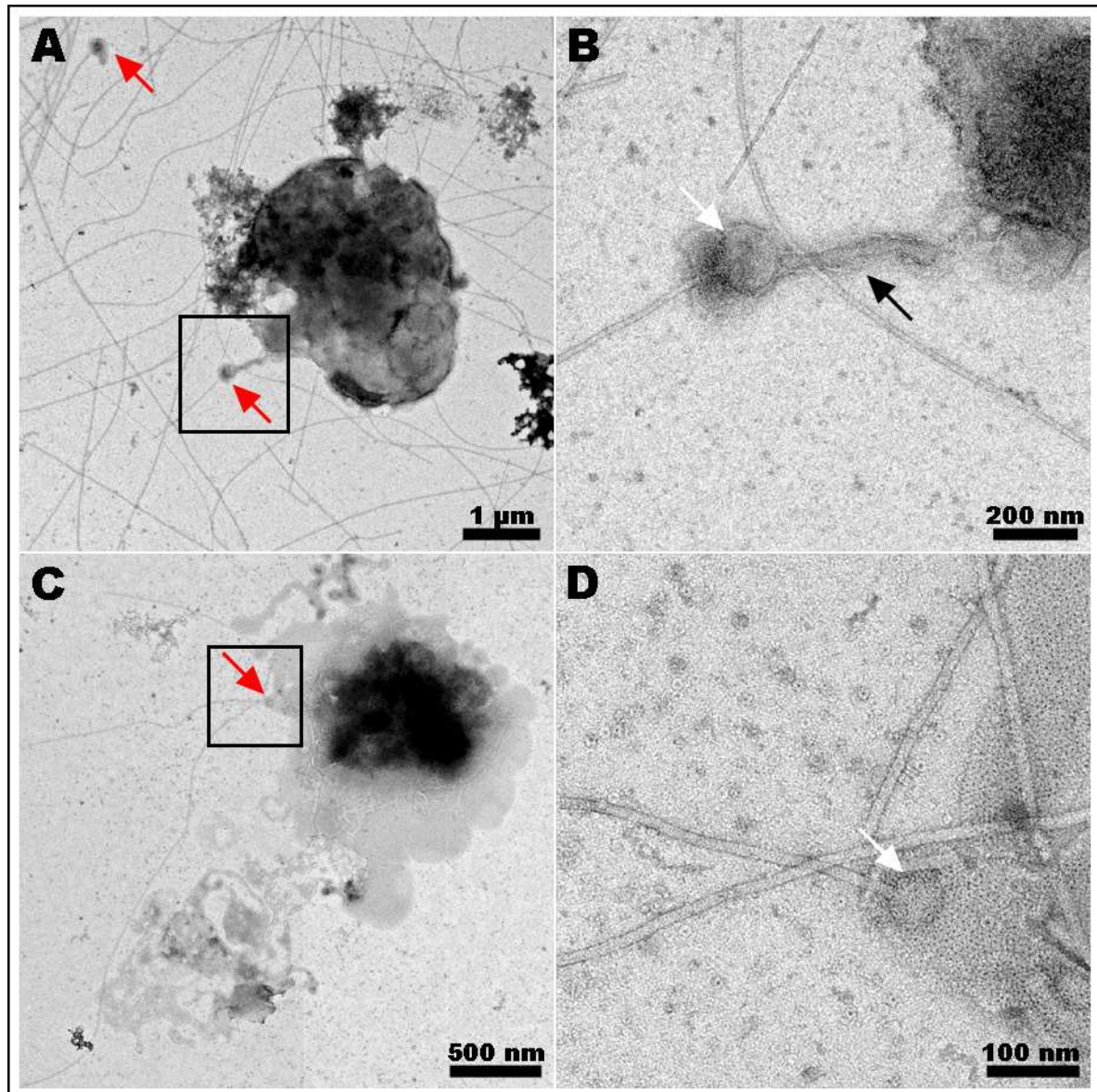


Abb. III.16: Komplexe in Verbindung mit auf kohlebeschichteten Goldgrids kultivierten *I. hospitalis*-Zellen, A und C: Übersichtsaufnahmen, rote Pfeile weisen auf Komplexe; Negativkontrastierungen; B und D: vergrößerter Ausschnitt des schwarzen Kastens aus A bzw. C, Verbindung des Komplexes mit der Zelle, weiße Pfeile weisen auf kugelige Strukturen aus welchen Fibers zu entspringen scheinen, schwarzer Pfeil kennzeichnet membranartigen Fortsatz (vgl. Abb. III.14)

Eine genauere Betrachtung der unter Abb. III.16 dargestellten Komplexe lässt deutlich erkennen, dass die Komplexe in Verbindung mit *I. hospitalis*-Zellen stehen, woraus geschlossen werden kann, dass diese Strukturen als möglicher Ausgangspunkt der Fibers zu betrachten sind. Beide Aufnahmen zeigen die Existenz von kugeligen Strukturen, von welchen die Fibers zu entspringen scheinen. Auch die Komplexe, die frei auf der Oberfläche beobachtet werden konnten (siehe Abb. III.14 und III.15), weisen derartige runde Ausgangsstrukturen auf, für welche Radien von 45–150 nm ermittelt werden konnten. Zudem zeigen alle Komplexe im Hinblick auf deren Aufbau und Zusammensetzung eine Beteiligung von verschiedenen Membran- bzw. Proteinstrukturen, wobei keine genauere Zuordnung der

Strukturen anhand der elektronenmikroskopischen Bilder getroffen werden konnte. Wie bereits für Abb. III.14 beschrieben, waren auch in Verbindung mit ganzen Zellen längliche, membranartige Fortsätze an den Komplexen zu verzeichnen (siehe Abb. III.16 B, schwarzer Pfeil).

Neben den eben beschriebenen Komplexen konnten auf bewachsenen Goldgrids weitere Strukturen gefunden werden, die eine vereinfachte Form bzw. eine Unterstruktur der Komplexe darstellen könnten. Drei dieser Strukturen sind in Abb. III.17 dargestellt:

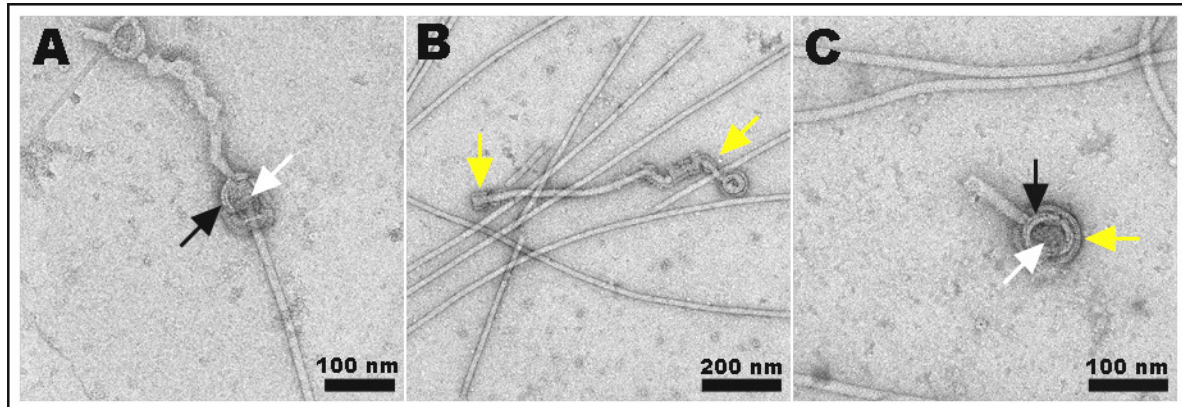


Abb. III.17: mögliche ‚Vorformen‘ der zuvor vorgestellten Komplexe, gefunden auf bewachsenen, kohlebeschichteten Goldgrids; alles Negativkontrastierungen, genauere Erläuterungen siehe Text

Die hier gezeigten Strukturen zeigen eine deutliche Ähnlichkeit zu den Strukturen, die in der roten Fraktion des CsCl-Gradienten gefunden werden konnten (siehe Abb. III.4 C, E und F). Auch hier steht die Fiber mit einer runden Struktur in Verbindung (gekennzeichnet durch schwarze Pfeile), die einen deutlich dunkler kontrastierten Bereich (gekennzeichnet durch weiße Pfeile) umschließt. Abb. III.17 B und C zeigen eine zusätzliche Umhüllung des hell kontrastierten Bereiches an (gelbe Pfeile Abb. III.17 B und C). Diese Umhüllung erstreckt sich in Abb. III.17 B nicht nur um die runde, hell kontrastierte Struktur, sondern zusätzlich um die ersten 200 nm der Fiber, welche in diesem umhüllten Bereich deutlich flexibler erscheint als in den Bereichen, welche nicht mit einer solchen Struktur in Assoziation stehen (vergleiche Abb. III.4). Ähnlich wie die runde Struktur (schwarze Pfeile), welche den zentralen Part (weiße Pfeile) umschließt, gleicht auch die umhüllende Struktur (gelbe Pfeile) Formen, die bereits innerhalb der Aufreinigung der Zellanhänge durch CsCl-Gradientenzentrifugation beschrieben werden konnten (siehe Abb. III.4 A, B, C, D und F, ‚röhrenartige Strukturen‘). Eine Ausmessung der Bestandteile der in Abb. III.17 dargestellten Strukturen mithilfe der Funktion Linescan ergab einen Radius von durchschnittlich 33 nm für den zentralen Part, einen Durchmesser von 10 nm für die runde Struktur sowie einen Durchmesser von 6-7,5 nm für die umhüllende Schicht. Für den Gesamtdurchmesser aller miteinander assoziierten Strukturen wurden Werte von 70-75 nm ermittelt.

4.2 Tomographische Analyse der Fiber-assoziierten Komplexe

Eine Tomographie der unter Kap. III.4.1 beschriebenen Komplexe sollte eine Einsicht in die räumliche Verteilung und Anordnung der einzelnen Komplexbestandteile vermitteln. Zu diesem Zweck wurden kohlebeschichtete, bewachsene und bereits kontrastierte Goldgrids, welche zahlreiche Komplexe aufwiesen, mit 15 nm Goldpartikeln als Referenzmarker versehen. Nach Aufzeichnung der Daten bei verschiedenen Kippwinkeln erfolgte die Auswertung der Bildserie mit Hilfe des Softwarepaketes TOM Toolbox (Nickel *et al.*, 2005) oder IMOD (Kremer *et al.*, 1996; Mastronarde, 2006). In folgender Abbildung sind Auszüge einer Kippserie eines mit einer Fiber assoziierten Komplexes dargestellt:

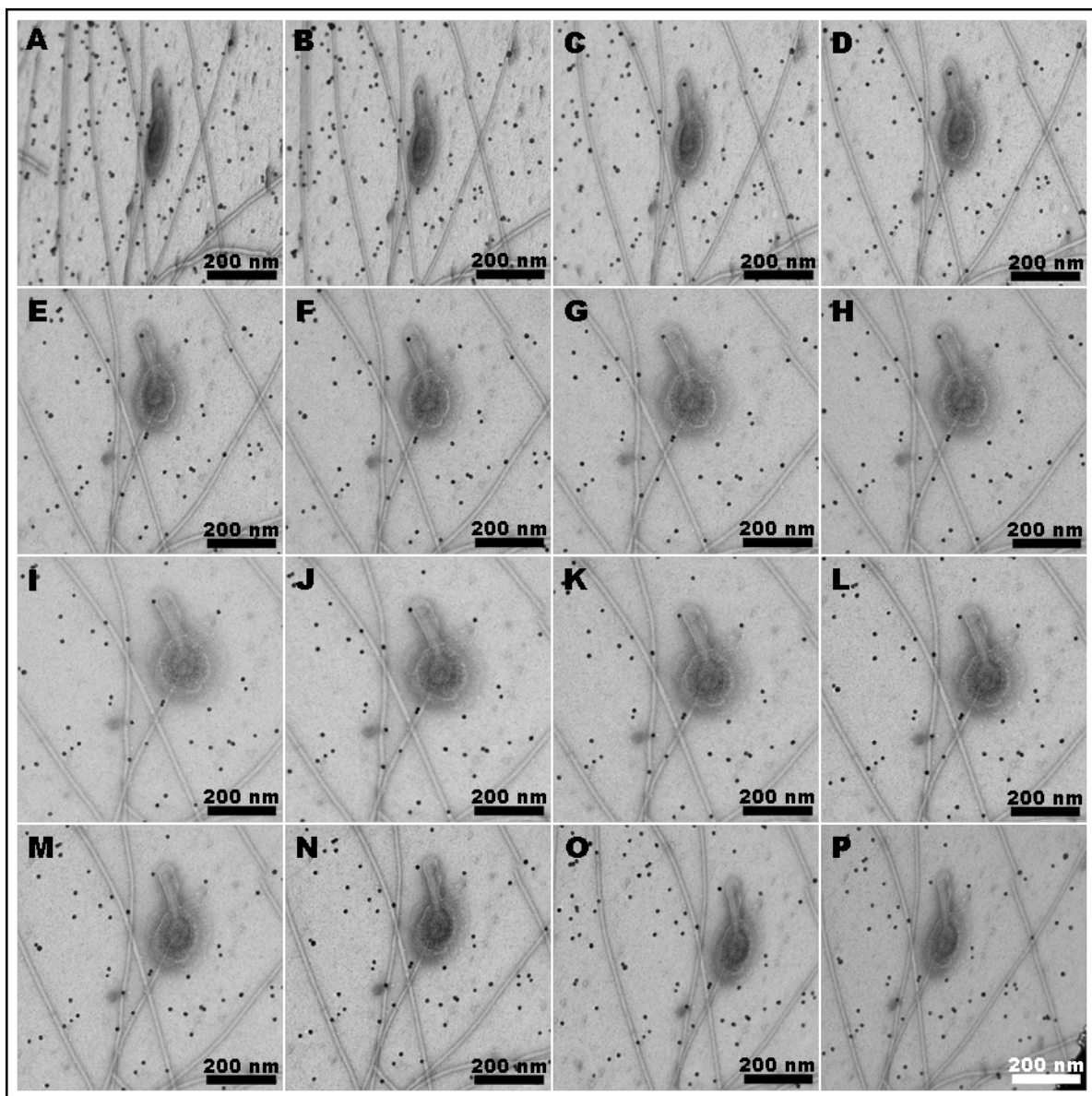


Abb. III.18: Auszüge aus der Kippserie eines Komplexes in welchen eine Fiber mündet, Kippwinkel: A: 68,23°; B: 63,32°; C: 57,43°; D: 50,39°; E: 42,24°; F: 32,86°; G: 22,52°; H: 11,43°; I: 0°; J: -11,43°; K: -22,53°; L: -32,88°; M: -42,22°; N: -50,42°; O: -57,43°; P: -60,51°; Negativkontrastierung

Eine Alignierung der Bilder fand über mehrere der in Abb. III.18 sichtbaren Goldpartikel statt, welche die Erstellung einer zueinander ausgerichteten Bilderserie ermöglichten. Nach einer Rekonstruktion über die WBP-Methode wurde ein Tomogramm aus 43 Schichten erhalten. In Abb. III.19 sind Bilder ausgewählter Schichten dieses Tomogrammes dargestellt. Das komplette Tomogramm ist Teil der Begleit-CD, welche im Anhang angeheftet ist. Des Weiteren erfolgte die Visualisierung des Tomogrammes mithilfe des Software-Paketes Amira, wobei sowohl das Modul *Voltex* als auch das Modul *SurfaceView* verwendet wurden. Auch diese beiden Rekonstruktionen sind Teil der Begleit-CD, die im Anhang angeheftet ist, zudem finden sich Abbildungen von beiden Darstellungsformen unter Kap. VI.3.

Die in Abb. III.19 dargestellten Abbildungen zeigen verschiedene Schichten des tomographierten Komplexes, aufsteigend von einer weiter unten gelegenen Schicht zu höher liegenden Schichten. Deutlich zu erkennen ist der Aufbau aus verschiedenen Strukturelementen. Klar zu identifizieren ist dabei die Fiber an sich (weißer Pfeil Abb. III.19 A und B), die in der Mitte des Komplexes endet und in einem Teil der Aufnahmen von einer runden Struktur umschlossen wird (schwarze Pfeile Abb. III.19 B und C). Dies konnte über die *SurfaceView*-Darstellung gezeigt werden, welche klar eine Umhüllung des Anfangsbereichs der Fiber durch diese Struktur offenbarte (s. Abb. VI.2). Diesem Bereich liegt wiederum eine rund- bis kugelförmige Struktur auf, die ein relativ glattes Erscheinungsbild, ohne ersichtliche Poren oder andere Substrukturen, zeigt (gelbe Pfeile Abb. III. 19 E und F). Bei genauer Analyse des Tomogrammes zeigt sich, dass diese Struktur auch in dem elongierten Fortsatz, der im linken, oberen Bereich der Bilder zu sehen ist, auftaucht (blauer Pfeil, Abb. III.19 D). Zudem weist dieser Fortsatz die gleiche Kontrastierung und das gleiche Erscheinungsbild wie die eben beschriebene, kugelförmige Struktur auf. Zwischen den beiden Bestandteilen ist keine sichtbare Abgrenzung zu verzeichnen, so dass die Möglichkeit besteht, dass es sich um eine zusammengehörige Struktur handelt, was auch in der *SurfaceView*-Darstellung impliziert wird. Vor allem in dem elongierten Bereich ist zu sehen, dass dieser Fortsatz von einer weiteren dünnen, membranartigen Struktur flankiert wird, welche allerdings nicht eindeutig um den kugelförmigen Bereich zu erkennen ist. Alle bisher beschriebenen Strukturen werden von einer in sich geschlossenen Proteinstruktur umhüllt, welche wohl die Cytoplasmamembran darstellt. Diese weist ein unregelmäßigeres Erscheinungsbild als die kugelförmige Struktur auf und zeichnet sich dadurch aus, dass keine schwarzen Poren darin zu erkennen sind (rote Pfeile Abb. III.19 C und D). Durch dieses Charakteristikum hebt sie sich klar von dem letzten Bestandteil des Komplexes ab, welcher als äußerste Umhüllung den Komplex umschließt und welcher durch das Auftauchen von 2 nm großen, schwarzen Poren eindeutig der äußeren Membran zugeordnet werden kann (grüne Pfeile Abb. III 19 D und E). Zudem sind zwei weitere Fibers in den linken Bildhälften zu erkennen, die jedoch in keiner Verbindung mit dem Komplex stehen.

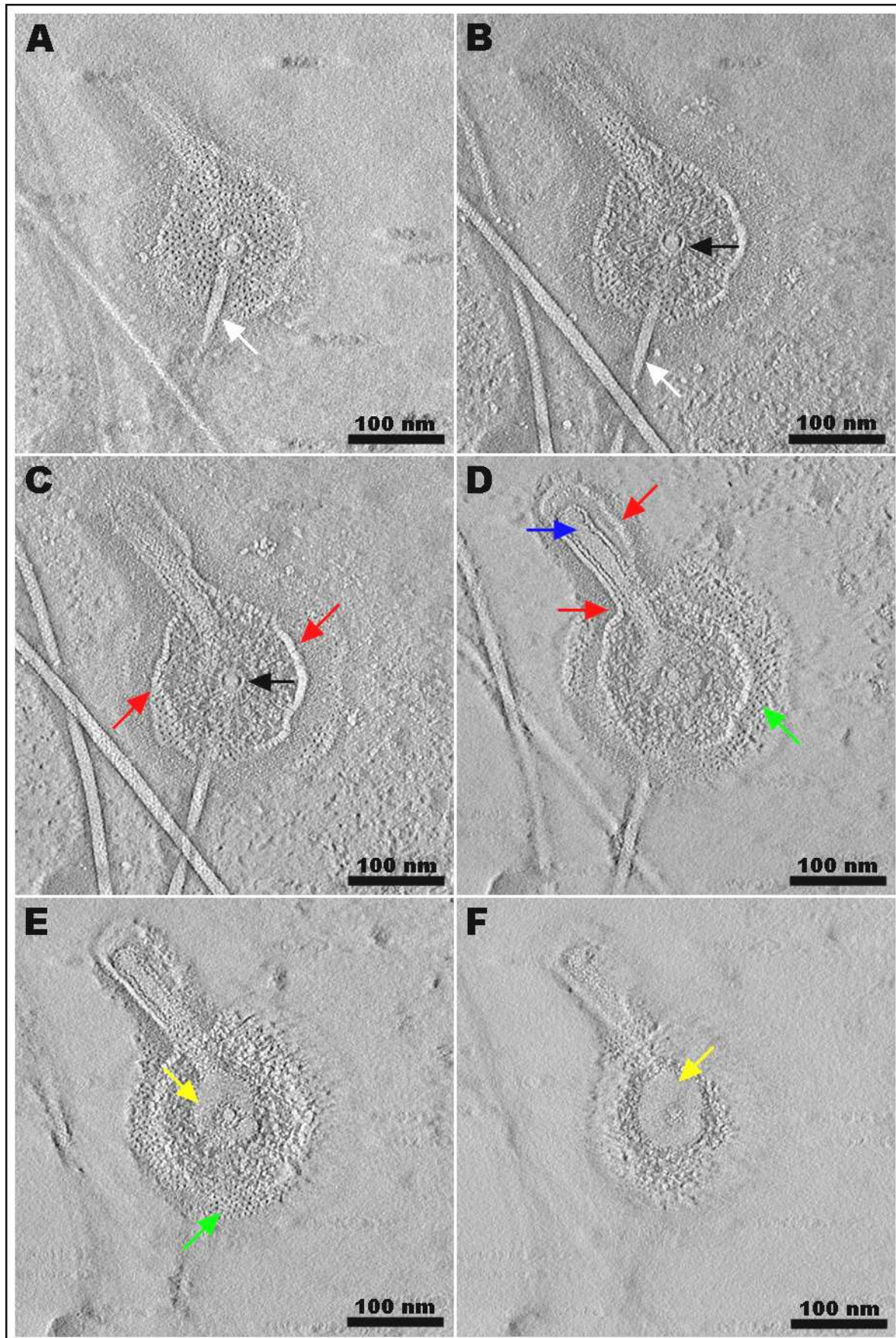


Abb. III.19: ausgewählte Ansichten des Tomogramms (aus insgesamt 43 Schichten bestehend, Schichtdicke ca. 0,75 nm), A: Schicht 7, B: Schicht 11, C: Schicht 13, D: Schicht 18, E: Schicht 21, F: Schicht 26; genauere Erläuterungen siehe Text

5 Lokalisation der Ankerstruktur der Fibers

Eine elektronenmikroskopische Analyse von bewachsenen Goldgrids offenbarte unter bestimmten Bedingungen (siehe Kap. III.4) eine Vielzahl von Komplexen, die als Verankerungsstelle der Fibers dienen könnten. Dabei war die Beteiligung von verschiedenen Membran- bzw. Proteintypen zu erkennen, welche nicht genauer definiert werden konnten. Zudem lagen die Komplexe meist frei, ohne eine Verbindung zu *I. hospitalis*-Zellen, bzw. nur in Assoziation mit lysierten oder stark beschädigten Zellen vor. Um die intrazelluläre Lokalisation bzw. Verankerung dieser Strukturen zu klären, wurden ausgewählte Ultradünnschnitte einer genauen elektronenmikroskopischen Analyse unterzogen. Des Weiteren sollten Immunmarkierungsexperimente an auf Suspensionspräparaten gefundenen Komplexen dazu dienen, eine Beteiligung der äußeren Membran nachweisen.

5.1 Lokalisation an Ultradünnschnitten

Um die Ankerstruktur der Fibers zu lokalisieren, wurden Ultradünnschnitte von hochdruckgefrorenen, gefriersubstituierten und in Epon eingebetteten *I. hospitalis*-Zellen angefertigt. Diese schonende Präparationsmethode sollte gewährleisten, dass die Zellen in einem bestmöglichen, nativen Zustand vorliegen, und eine präparationsbedingte Artefaktbildung weitestgehend minimieren. Nach der Kontrastierung der Ultradünnschnitte lag das Hauptaugenmerk auf der Identifikation von Stellen, welche eine Lokalisation des Fiberankers ermöglichen sollten. Hierbei handelte es sich vordergründig um Stellen, an welchen eine Fiber an einer für die Lokalisation der Ankerstruktur günstigen Stellen im Längsschnitt getroffen wurde. Es waren vor allem Stellen, an denen die Fiber die äußere Membran oder das Periplasma passierte, von Interesse sowie Stellen, an denen die Fiber vermeintlich mit der Cytoplasmamembran in Kontakt stand.

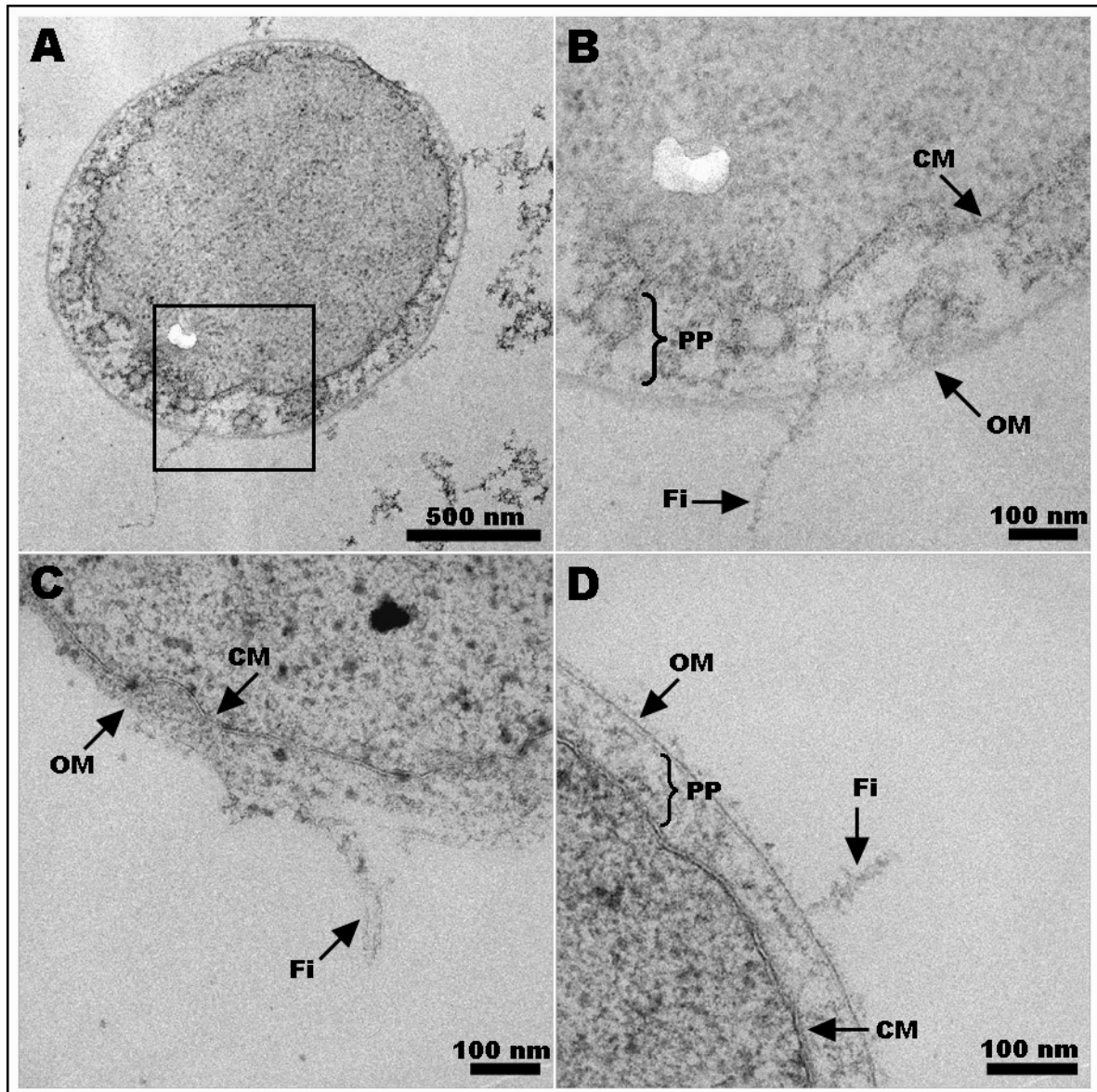


Abb. III.20: Ultradünnschnitte von in Cellulosekapillaren kultivierten *I. hospitalis*-Zellen nach HPF, FS und Einbettung in Epon, alle Aufnahmen zeigen Längsschnitte durch Fiberbereiche, A: ganze Zelle mit Fiber-Längsschnitt unten, durch schwarzen Kasten hervorgehoben; B: vergrößerter Ausschnitt des schwarzen Kastens aus A; C und D: vergrößerte Längsschnitte von Fibers unterschiedlicher *I. hospitalis*-Zellen und deren Verbindung mit den Zellen; alles Negativkontrastierungen (incl. Kontrastverstärkung mit PbCi); OM: äußere Membran, CM: Cytoplasmamembran, PP: Periplasma, Fi: Fiber

In Abb. III.20 ist eine Auswahl an Aufnahmen dargestellt, die Stellen zeigen, an welchen die Fibers in bestimmten Bereichen als Längsschnitt zu erkennen sind. Eine Darstellung solcher Abschnitte gelang meist nur über sehr kurze Abschnitte von ca. 200 nm; nur in Ausnahmefällen konnten Bereiche von über 500 nm als Längsschnitt dargestellt werden. Dies ist im Vergleich mit der Gesamtlänge der Fibers (auf bewachsenen Goldgrids Fibers mit Längen von mehreren 20 µm) ein sehr kurzer Abschnitt, liegt aber darin begründet, dass sich die Fibers nicht exakt in der Ebene des Ultradünnschnitts (Dicke ca. 50 nm) von der Zelle weg erstrecken. Vielmehr dürfte eine Fiber über mehrere Schnittebenen der Ultra-

dünnschnitte verteilt vorliegen. Zudem muss die Möglichkeit, die Fiber quer zu schneiden berücksichtigt werden. Klar ersichtlich ist, dass die Fibers in Abb. III.20 B und D die äußere Membran durchqueren. Aufgrund der zahlreichen feinen Strukturen innerhalb des periplasmatischen Raumes kann in Abb. III.20 B jedoch nicht eindeutig erkannt werden, ob sich die Fiber durch die Cytoplasmamembran erstreckt, oder ob sie in dieser Zelle im periplasmatischen Raum endet. Abb. III.20 D dagegen zeigt, dass die Fiber zweifelsfrei mit der Cytoplasmamembran in Kontakt steht; ob sie durch diese hindurch verläuft kann auch hier nicht eindeutig geklärt werden. Allerdings wird bei genauerer Betrachtung der Eindruck vermittelt, dass die Fiber die Cytoplasmamembran überwindet, da diese an der hypothetischen Übertrittsstelle unterbrochen zu sein scheint.

Dennoch ist zu bemerken, dass in allen Aufnahmen keine strukturell definierten Verankerungsstrukturen, die Teil der unter Kap. III.4 beschriebenen Komplexe darstellen könnten, zu erkennen sind. Dessen ungeachtet ist festzustellen, dass alle hier gezeigten Zellen in einem guten Zustand erscheinen. Die Membranen sind klar erkennbar, die äußere Membran ist geschlossen und auf der Oberfläche einiger Zellen sind feine Strukturen zu erkennen, bei denen es sich um Glykosylierungen handeln könnte. Zudem erscheint das Cytoplasma dicht gepackt und regelmäßig, was alles auf einen sehr guten Erhalt der Zellen hindeutet. Auch die Tatsache, dass überhaupt Zellanhänge dargestellt werden konnten, spricht für eine bestmögliche Bewahrung der nativen Struktur.

5.2 Tomographie

Um eine verbesserte Darstellung des Bereichs, in dem die Fiber auf dem in Abb. III.20 A bzw. B dargestellten Ultradünnschnittes mündet, zu erhalten, wurde eine tomographische Analyse wie unter Kap. II.14.2.2 beschrieben, durchgeführt. Das im Rahmen dieser Tomographie erstellte *Movie* ist dabei auf der Begleit-CD im Anhang zu finden. In folgender Abbildung wurden nun die zwei Ebenen, in welchen einerseits die Fiber, andererseits die äußere sowie die cytoplasmatische Membran zu erkennen sind, einzeln, als auch in übereinander gelegter Form, abgebildet:

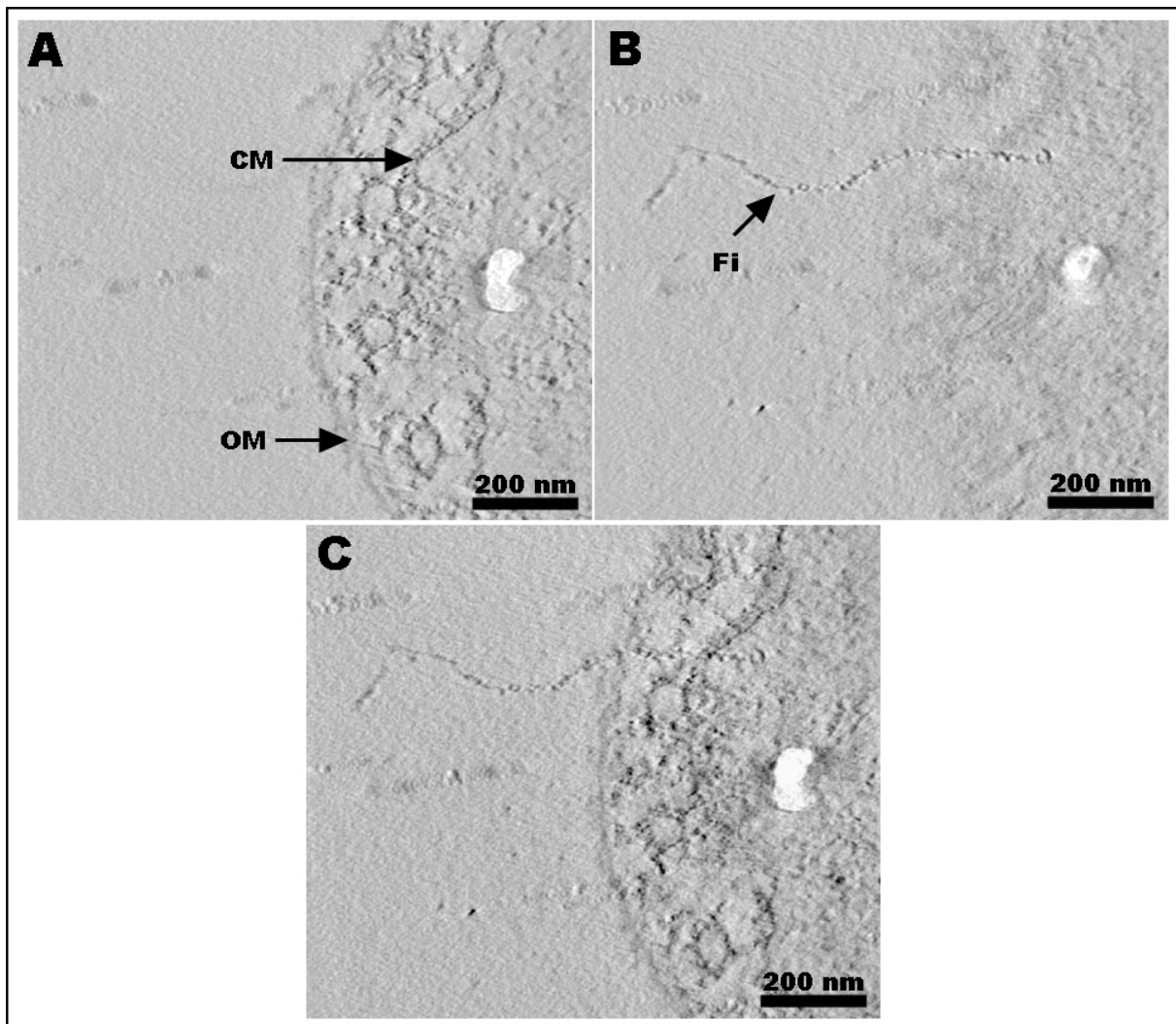


Abb. III.21: durch Tomographie ermittelte Schichten (Schichtdicke ca. 1,8 nm) A: der äußeren und cytoplasmatischen Membran; B: der Fiber; C: Überlagerung von A und B; OM: äußere Membran, CM: Cytoplasmamembran, Fi: Fiber

Abb. III.21 lässt klar erkennen, dass die abgebildete Fiber die Cytoplasmamembran der *Ignicoccus*-Zelle durchquert und in einer runden Struktur ca. 65 nm unterhalb der Cytoplasmamembran mündet. Dabei konnte für die runde Struktur ein Radius von in etwa 35 nm ermittelt werden. Eine Verankerung der Fiber innerhalb der äußeren Membran sowie innerhalb des periplasmatischen Raumes kann somit ausgeschlossen werden.

5.3 Immunmarkierung der Komplexe mit rabbit anti-Ihomp1

Einen weiteren Hinweis, dass die Verankerungsstruktur der Fibers unterhalb der Cytoplasmamembran lokalisiert ist, konnte mit Immunmarkierungsexperimenten mit dem rabbit anti-Ihomp1 Antikörper gewonnen werden. Bei diesen Experimenten wurden Komplexe, welche auf bewachsenen Goldgrids gezielt generiert wurden, einer Immun-

markierung mit diesem Antikörper unterzogen, um eine Beteiligung bzw. das Vorhandensein der äußeren Membran zu untersuchen.

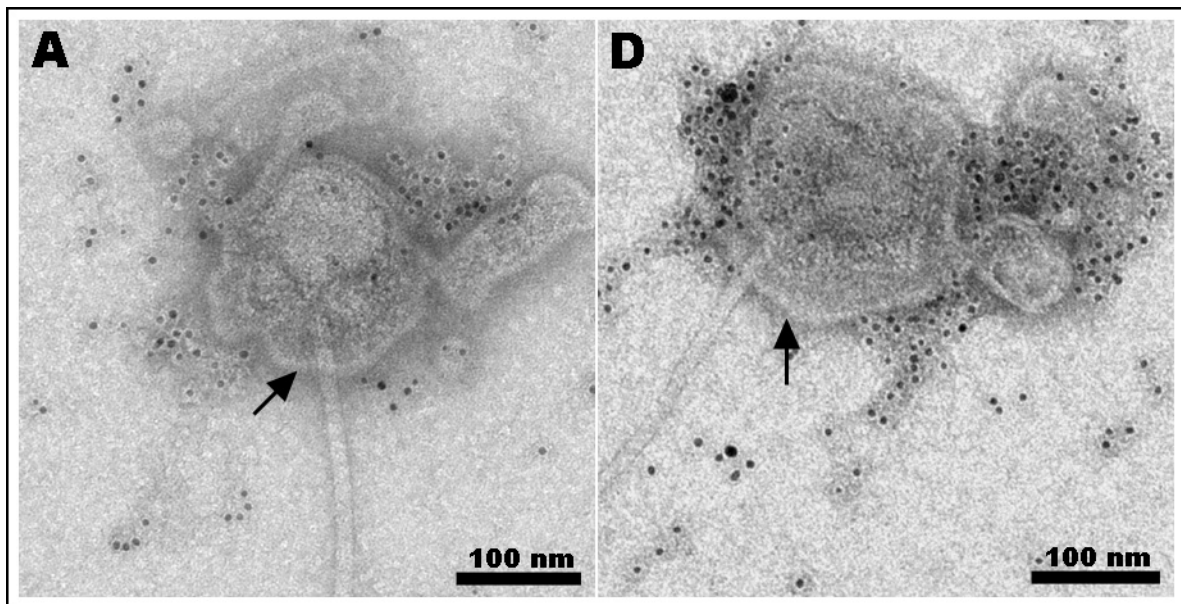


Abb. III.22: Immunmarkierung der auf kohlebeschichteten, bewachsenen Goldgrids generierten Komplexe; prim. Antikörper rabbit anti-Ihomp1 1:10, sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + 6 nm Gold 1:10; Negativkontrastierungen

Die Immunmarkierung der Komplexe mit dem gegen das dominierende Protein der äußeren Membran gerichteten Antikörper weist fast ausschließlich Signale in der Peripherie der Komplexe auf (siehe Abb. III.22). Eine direkte Markierung der Membran (schwarze Pfeile), die die runde Struktur, in welche die Fiber mündet, umschließt, ist nur sporadisch nachzuweisen. Dies bedeutet, dass es sich bei der Membran, die die hier gezeigten Komplexe unmittelbar umschließt, nicht um die äußere Membran, sondern mit hoher Wahrscheinlichkeit um die Cytoplasmamembran handelt. Die äußere Membran liegt bei diesen Komplexen vielmehr als Rest in Teilstücken um diese Membran herum angeordnet vor und zeigt zahlreiche Antikörpersignale. Allerdings sei an dieser Stelle vermerkt, dass auch Komplexe gefunden werden konnten, die neben der Cytoplasmamembran zusätzlich komplett von der äußeren Membran als äußerste Schicht umgeben waren (vgl. Abb. III.18). Bei derartigen Komplexen zeigte sich eine starke Markierung über die komplette Oberfläche der Komplexe (Daten nicht gezeigt).

6 Klonierung und Expression

6.1 Sequenzanalysen zu Iho670

Den Hintergrund der Polymerisationsexperimente bildeten Sequenzanalysen, die mit Hilfe von Datenbanken bzw. Vorhersageprogrammen erstellt wurden. Dabei wurde einerseits die NCBI Proteindatenbank (Version: Juli 2008), andererseits die KEGG Datenbank (Version: Januar, 2010) verwendet, um Sequenzähnlichkeiten des Iho670-Proteins mit weiteren hinterlegten Proteinen zu ermitteln. Des Weiteren wurden verschiedene Vorhersageprogramme verwendet, um die Sekundärstruktur des Iho670-Proteins genauer zu analysieren. Folgende Algorithmen kamen zum Einsatz: FlaFind, SOSUI, TMHMM, Phobius, Tmpred, MaxSubSeq und MINNOU.

Das Ergebnis der Datenbanksuche gegen die NCBI Proteindatenbank, wobei speziell nach sequenzähnlichen, archaeellen Proteinen gesucht wurde, ist in Abb. III.23 dargestellt:

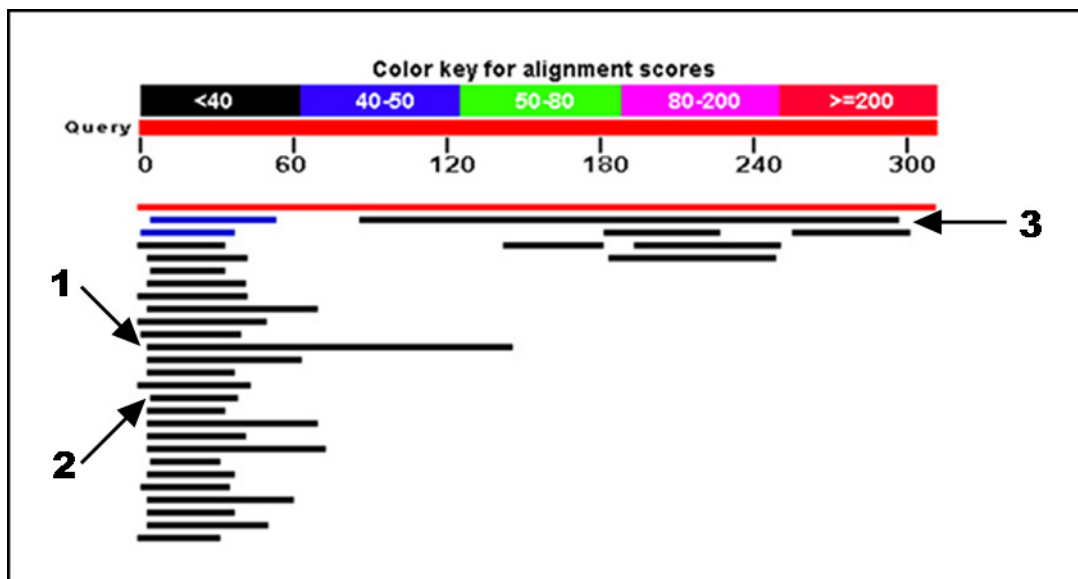


Abb. III.23: Ergebnis der NCBI-Datenbanksuche nach sequenzähnlichen, archaeellen Proteinen zu Iho670; Pfeile: ausgewählte Proteine, 1 und 2: archaeal flagellin N-terminal-like domain protein [*A. boonei* T469]; 3: hypothetical protein Igri_0668 [*I. hospitalis* KIN4/I]

Das Ergebnis zeigt mehrere Übereinstimmungen im N-terminalen Bereich des Iho670-Proteins, wobei der höchste Score-Wert bei 46,6 liegt. Bei allen Proteinen, die der N-terminalen Sequenz von Iho670 ähneln, handelt es sich mit zwei Ausnahmen (Pfeile 1 und 2) um hypothetische Proteine oder um archaeelle Proteine unbekannter Funktion. Lediglich zwei Proteine zeigten eine Zuordnung zu *Aciduliprofundum boonei* T469, wobei diese Proteine als *N-terminal-like domain* Proteine archaeeller Flagelline angegeben werden. Im Folgenden ist zur besseren Veranschaulichung eine Gegenüberstellung der N-Termini von

Igni_0670 und den ersten sieben *Hits* der NCBI-Datenbankrecherche dargestellt. Die Darstellung erfolgte mit dem Vorhersageprogramm ClustalW2 (Oliver *et al.*, 2005).

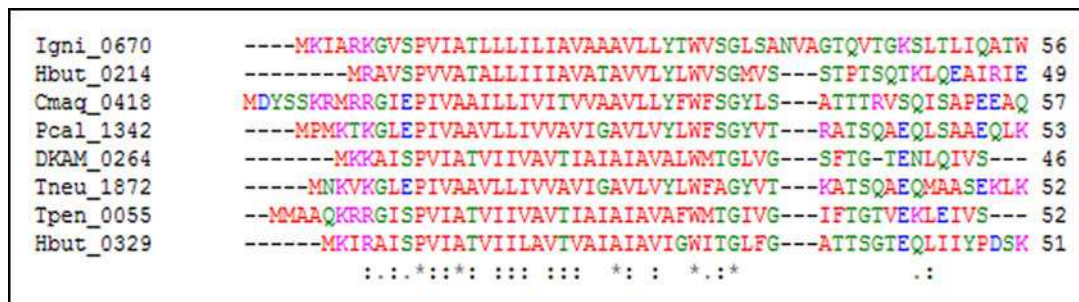


Abb.III.24: Gegenüberstellung der N-Termini von Igni_0670 und den ersten 7 Hits der unter Abb. III.23 dargestellten BLAST-Search Analyse, Darstellung über ClustalW2

Abb. III.24 zeigt, dass der N-terminale Bereich der dargestellten Proteine Sequenz-ähnlichkeiten mit Igni_0670 aufweist. Ein Großteil der Aminosäuren ist identisch zu Igni_0670 bzw. weist konservierte und semi-konservierte Aminosäurenaustausche auf. Im Kernbereich der Sequenzen mit hoher Übereinstimmung, der sich im Bereich von AS 6-34 in Bezug auf die Igni_0670 Sequenz befindet, ist zudem auffällig, dass ein Großteil der Aminosäuren zur Klasse der hydrophoben Aminosäuren zuzuordnen ist.

Zudem konnte in der in Abb. III.23 gezeigten Blast Search Analyse mit Igni_0668 ein zu Igni_0670 sequenzähnliches Protein mit einem Score-Wert von 36,6 identifiziert werden. Dieses Protein wird in der KEGG-Datenbank als Paralog des Fiber-Proteins Igni_0670 vorgeschlagen.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass Igni_0670 ein seither einzigartiges Protein darstellt, das mit Ausnahme der N-terminalen Region keine Homologien zu Proteinen anderer Archaeen besitzt. Diese N-terminale Region scheint in einigen anderen Archaeen konserviert zu sein, wenngleich diese Konservierung relativ schwach erscheint. Ähnliche Beobachtungen im Hinblick auf eine Konservierung der N-terminalen Region von Proteinen konnten bereits für archaeele Flagelline gemacht werden, wobei deren N-Termini in Verdacht stehen, an der Polymerisation des Flagellenfilaments beteiligt zu sein (Thomas *et al.*, 2001).

Weitere Analysen über Sekundärstrukturvorhersageprogramme sollten genauere Einblicke in die Struktur des Iho670-Proteins gewähren. Dabei zeigte sich, dass der N-Terminus von Igni_0670 von allen verwendeten Algorithmen als Bereich einer α -helikalen Transmembran-helix erkannt wird. Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die verschiedenen Programme und deren Vorhersagen:

Tabelle III.3: Übersicht über die verwendeten Vorhersageprogramme zur Identifizierung potentieller Transmembranhelices, AS: Aminosäure, fett gedruckt: Position der N-terminalen Transmembranhelix

Programm	Anzahl vorhergesagter Transmembranhelices	Position der Helices	AS-Sequenz der N-terminalen Transmembranhelix
FlaFind	2	AS 7 - 29	GVSPVIATLLLILIAVAAAVLLY
SOSUI	3	AS 9 - 31 AS 77 - 99 AS 123 - 145	SPVIATLLLILIAVAAAVLLYTW
TMHMM	2	AS 7 - 29 AS 126 - 148	GVSPVIATLLLILIAVAAAVLLY
Phobius	1	AS 12 - 32	IATLLLILIAVAAAVLLLYTW
TMpred	3	AS 10 - 31 AS 126 - 144 AS 264 - 286	PVIATLLLILIAVAAAVLLLYT
MaxSubSeq	3	AS 11 - 31 AS 130 - 147 AS 261 - 278	VIATLLLILIAVAAAVLLLYT
MINNOU	1	AS 10 - 36	PVIATLLLILIAVAAAVLLLYTWVSG

Wie Tab. III.3 zeigt, positionieren die verwendeten Algorithmen die N-terminale Transmembranhelix stets in einen Bereich zwischen der 7. und der 36. Aminosäure. Zudem identifizierten die Programme FlaFind, SOSUI, TMHMM, TMpred und MaxSubSeq eine bzw. zwei weitere Transmembranhelices in weiter C-terminal gelegenen Bereichen von Igni_0670.

Zum besseren Verständnis seien hier nun noch einmal sämtliche bekannten Fakten zusammengefasst, die für die nachfolgenden Polymerisationsexperimente eine Rolle spielen:

- Der N-terminale Bereich von Igni_0670 wird von verschiedenen Vorhersageprogrammen als Bereich einer Transmembranhelix angezeigt. Allerdings handelt es sich bei den Iho670-Fibers um extrazelluläre Proteinkomplexe, die filamentförmig außerhalb der Zelle zu finden sind.
- Eine N-terminale Sequenzierung aufgereinigter Fibers beginnt an Position 8 mit den Aminosäuren VSPVIA, was belegt, dass es im Verlauf der Fiberassemblierung zu keiner Abspaltung der Domäne kommt, welche als Transmembranhelix vorhergesagt wird.
- Iho670 zeigt bei Datenbankrecherchen, dass dessen putativ α -helikaler, hydrophober N-Terminus in einigen anderen Archaeen schwach konserviert zu sein scheint. Archaeelle Flagelline zeigen das gleiche Phänomen, wobei hier vermutet wird, dass dieser Bereich eine wesentliche Rolle bei der Polymerisation der Flagellinuntereinheiten spielt.

Die oben aufgeführten Punkte führten dabei zu folgendem Experiment: Durch eine Herstellung von rekombinanten Iho670-Konstrukten sollte überprüft werden, ob Iho670 in der Lage ist spontan Polymere zu bilden. Zudem sollte geklärt werden, ob die N-terminale Domäne einen Einfluss auf eine Polymerisation von Iho670-Monomeren zu oligomeren Formen hat. Aus diesem Grund wurden Konstrukte generiert, deren N-terminale Transmembranhelix deletiert wurde, da dieser Bereich als essentiell für die Polymerisation vermutet wurde.

6.2 Klonierung und Expression der *igni_0670*-Konstrukte

Zur Untersuchung des Polymerisationsverhaltens des Fiberproteins Iho670 wurden verschiedene Varianten des zugehörigen *igni_0670*-Genes kloniert. Folgende Tabelle soll einen Überblick über die Bezeichnung, Herstellung und Aufreinigung der verschiedenen Konstrukte geben:

Tabelle III.4: Übersicht über die verschiedenen Konstrukte des Iho670-Proteins

Bezeichnung	Primer	Aufreinigung	N-terminale Helix
Igni_0670 _{rek1}	Igni_0670_for_NdeI Igni_0670_rev_XhoI	His-Tag	ja
Igni_0670kurz _{rek1}	Igni_0670kurz_for_NdeI Igni_0670_rev_XhoI	His-Tag	nein
Igni_0670 _{rek2}	Igni_0670_for_NdeI Igni_0670_rev_KpnI	His-Tag + Thrombinschnittstelle	ja
Igni_0670kurz _{rek2}	Igni_0670kurz_for_NdeI Igni_0670_rev_KpnI	His-Tag + Thrombinschnittstelle	nein

Zu diesem Zweck wurde der entsprechende Leserahmen, das *igni_0670*-Gen bzw. die N-terminal deletierte Variante, mit den in Tabelle III.4 angegebenen Primern über PCR amplifiziert. Nach Zwischenklonierung in den Vektor pJoe erfolgte eine Klonierung in den Expressionsvektor pET29b. Eine Testexpression ergab für die Konstrukte Igni_0670_{rek1} und Igni_0670_{rek2} eine optimale Expression für 3 Stunden bei 30°C; für die Konstrukte Igni_0670kurz_{rek1} bzw. Igni_0670kurz_{rek2} wurde eine optimale Expression bei 37°C für 3 Stunden festgestellt (Daten nicht gezeigt). Als Expressionsstamm diente in allen Fällen der *E. coli*-Stamm Rosetta(DE3)pLysS. Die Expression der Proteine wurde über SDS-PAGE und Immunlokalisation mit einem His-Tag-spezifischen Antikörper überprüft. Dabei konnten bereits Unterschiede in der Expression der einzelnen Konstrukte festgestellt werden.

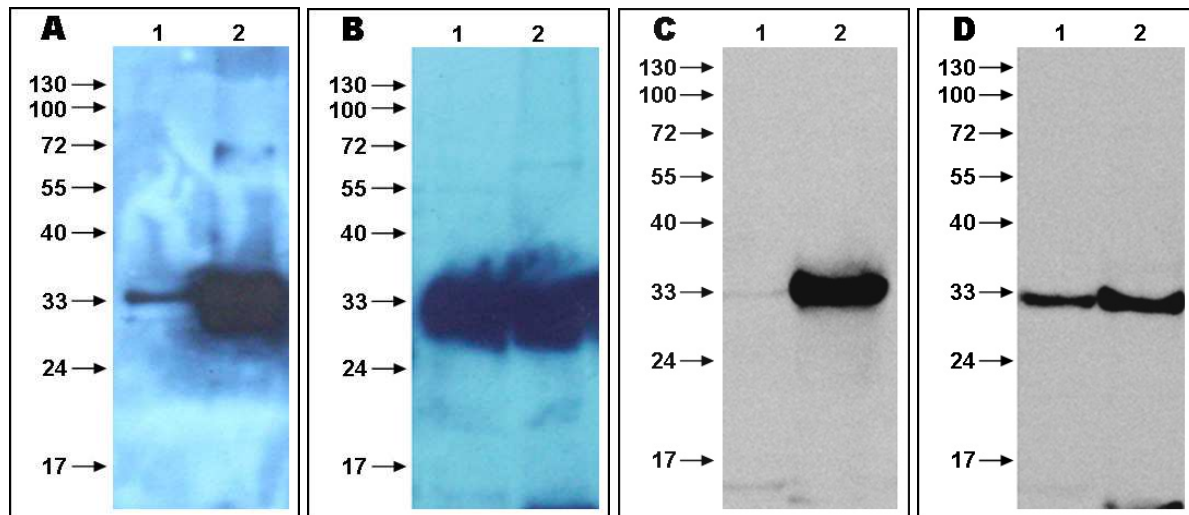


Abb. III.25: Western Blot der Rohextrakte der exprimierten Igni_0670 Konstrukte, eingesetztes Protein in A: ca. 10 µg, in B: ca. 30 µg, in C und D: ca. 5 µg

A: Spur 1: Überstand Igni_0670_{rek1}, Spur 2: Pellet Igni_0670_{rek1}; B: Spur 1: Überstand Igni_0670_{kurzrek1}, Spur 2: Pellet Igni_0670_{kurzrek1}; A und B: prim. Antikörper mouse anti-His 1:1000, sek. Antikörper anti-mouse IgG + Meerrettich Peroxidase 1:10.000

C: Spur 1: Überstand Igni_0670_{rek2}, Spur 2: Pellet Igni_0670_{rek2}; D: Spur 1: Überstand Igni_0670_{kurzrek2}, Spur 2: Pellet Igni_0670_{kurzrek2}; C und D: prim. Antikörper mouse anti-His 1:5000, sek. Antikörper anti-mouse IgG + Meerrettich Peroxidase 1:10.000

jeweils links: Proteinmassenstandard in kDa

Abb. III.25 zeigt, dass sowohl Igni_0670_{rek1} als auch Igni_0670_{rek2} fast ausschließlich in der Pelletfraktion lokalisiert werden können; eine Lokalisation im Überstand ist bei beiden Konstrukten nur zu einem sehr geringen Teil möglich. Anders verhält es sich mit den Proteinen Igni_0670_{kurzrek1} bzw. Igni_0670_{kurzrek2}, welche zu fast identischen Anteilen sowohl im Pellet als auch im Überstand zu detektieren sind. Zudem zeichnen sich bereits in bestimmten Fraktionen der Testexpression mögliche Dimerformen der Proteine Igni_0670_{rek1} und Igni_0670_{kurzrek1} im Western Blot ab (siehe Abb. III.25 A, Spur 1, Pelletfraktion, ca. 70 kDa). Eine Abschätzung der relativen molekularen Massen der Proteine liegt in den erwarteten Bereichen. So konnte für Igni_0670_{rek1} ein Wert von ca. 35 kDa und für Igni_0670_{kurzrek1} ein Wert von ca. 33 kDa abgeschätzt werden. Auch die Konstrukte Igni_0670_{rek2} und Igni_0670_{kurzrek2} liegen mit relativen molekularen Massen von ca. 36 kDa bzw. 34 kDa in den erwarteten Bereichen.

Nach einer Expression im großen Maßstab wurden die Proteine nach Herstellerangaben über Protino® Ni-TED 2000 packed columns aufgereinigt. Die Aufreinigungseffizienz wurde über SDS-PAGE kontrolliert; zudem erfolgte eine N-terminale Sequenzierung der rekombinanten Proteine, welche eine erfolgreiche Expression und Reinigung bestätigte (Daten nicht gezeigt). Die Konstrukte Igni_0670_{rek2} und Igni_0670_{kurzrek2} wiesen neben einem His-Tag zur Aufreinigung zusätzlich eine Thrombinschnittstelle auf, die eine proteolytische Entfernung des His-Tags erlaubte. Diese Abspaltung wurde wie unter Kap.

II.9.2 beschrieben durchgeführt. In Abb. III.26 sind nun alle exprimierten Proteine, die in die Polymerisationsversuche eingesetzt wurden, nach deren Aufreinigung dargestellt.

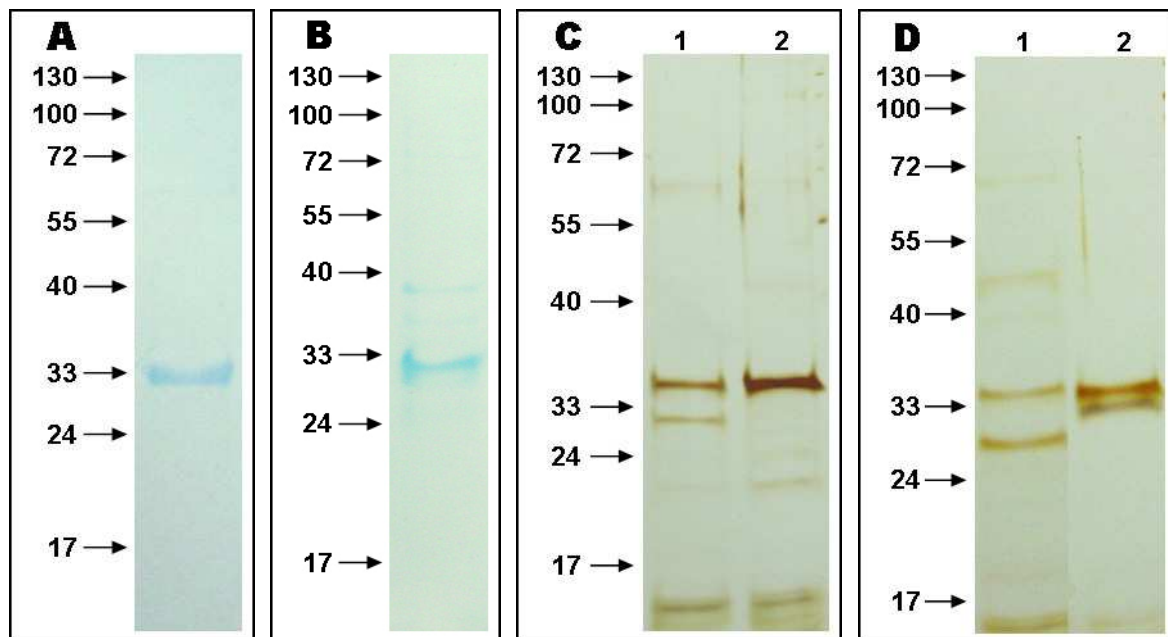


Abb. III.26: SDS-PAGEs der exprimierten, aufgereinigten Igni_0670-Konstrukte, jeweils ca. 5 µg Protein aufgetragen, A: Igni_0670_{rek1}, Coomassie-Färbung; B: Igni_0670kurz_{rek1}, Coomassie-Färbung; C: Igni_0670_{rek2}, Spur 1: nach Thrombinverdau, Spur 2: vor Thrombinverdau, Silberfärbung; D: Igni_0670kurz_{rek2}, Spur 1: nach Thrombinverdau, Spur 2: vor Thrombinverdau, Silberfärbung; jeweils links: Proteinmassenstandard in kDa

Wie Abb. III.26 zeigt, bilden die exprimierten und aufgereinigten Igni_0670-Proteinvarianten in allen Fällen die dominierende Proteinspezies, dennoch treten in den meisten Fällen auch nach der Aufreinigung Verschmutzungen durch andere Proteine auf. Eine Identifikation dieser Proteine wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht angestellt. Die erzielten Proteinkonzentrationen der exprimierten Proteine lagen nach der Aufreinigung über Protino[®] Ni-TED packed columns in Bereichen von 0,3-1 µg/µl, bei den Konstrukten, die weiterhin mit Thrombin verdaut wurden, bei ca. 0,2 µg/µl.

Wie bereits in Abb. III.25 beschrieben, liegen die relativen molekularen Massen in den für die Proteinkonstrukte zu erwartenden Bereichen. Die Proteine Igni_0670_{rek2} und Igni_0670kurz_{rek2} zeigten sich nach der Behandlung mit Thrombin zu ca. 50% in verdauter Form; der Rest lag jedoch weiterhin als unverdautes Protein vor (vgl. Abb. III.26 C und D). Grundsätzlich zeigten jedoch alle Proteine einen hohen Reinheitsgrad, so dass sie in die Polymerisationsexperimente eingesetzt werden konnten.

6.3 Klonierung und Expression von *igni_0668* incl. Immunmarkierung

Durch Sequenzanalysen konnte Igni_0668 als hypothetisches Paralog des Fiber-Proteins Iho670 identifiziert werden. Weitere Vorhersagen lassen vermuten, dass die Gene *igni_0668* bis *igni_0677* im Genom von *I. hospitalis* counterclockwise transkribiert werden, was auf eine Organisation innerhalb eines Operons hinweisen könnte, zumal der maximale Bereich zwischen den Genen nur 73 Nukleotide beträgt (Podar *et al.*, 2008). Durch eine Klonierung des *igni_0668*-Gens, einer erfolgreichen Expression und einer anschließenden Produktion von polyklonalen Antikörpern gegen das rekombinante Protein, sollte im weiteren Verlauf eine mögliche Beteiligung von Igni_0668 beim Aufbau der Fibers geklärt werden. Zu diesem Zweck wurde das *igni_0668*-Gen mit den Primern Igni_0669mitte_for und Igni_0668_rev_XhoI über PCR amplifiziert und sequenziert. Dabei zeigte das Ergebnis keine Abweichung von der in den Datenbanken hinterlegten Sequenz. Aus diesem Grund erfolgte eine PCR-Amplifikation mit den Primern Igni_0668_for_NdeI und Igni_0668_rev_XhoI, eine Zwischenklonierung in den Vektor pJoe und eine Klonierung in den Expressionsvektor pET29b. Im Anschluss erfolgte die Expression für 6 h bei 37 °C in Rosetta(DE3)pLysS.

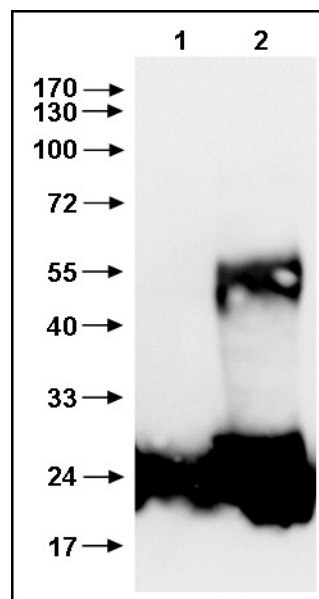


Abb. III.27: Western Blot des Rohextraktes von Igni_0668_{rek}, eingesetztes Protein 10 µg; Spur 1: Überstand, Spur 2: Pellet; prim. Antikörper mouse anti-His 1:5000, sek. Antikörper anti-mouse IgG + Meerrettich Peroxidase 1:10.000; links: Proteinmassenstandard in kDa

Abb. III.27 zeigt, dass das rekombinante Igni_0668-Protein (Igni_0668_{rek}) sowohl im Überstand, jedoch zum überwiegenden Teil im Pellet nachzuweisen ist. Auch hier sind in der Pelletfraktion dimere Formen des Proteins zu detektieren. Nach einer Aufreinigung von Igni_0668_{rek} unter nativen Bedingungen mit Hilfe von Protino Ni-TED 150 packed columns, erfolgte ein enzymatischer In-Gel-Verdau und eine Sequenzierung über MALDI-TOF MS/MS,

welche eine korrekte Expression bestätigte. Somit konnte das Protein Igni_0668_{rek} zur Generierung von polyklonalen Antikörpern in rabbit und chicken eingesetzt werden.

Immunmarkierungen mit dem ersten Testserum des rabbit anti-Igni_0668_{rek} Antikörpers ergaben eine schwache Markierung von Strukturen der äußeren sowie der cytoplasmatischen Membran, wobei eine Markierung der äußeren gegenüber der cytoplasmatischen Membran bevorzugt war (vgl. Abb. III.28 A, alle Pfeile kennzeichnen Antikörpersignale). Dabei war auffällig, dass der Antikörper an diesen Strukturen meist in Form von Antikörperclustern zu detektieren war. Zudem erfolgte eine ausgeprägte Markierung an solchen Stellen, an denen längliche Strukturen, bei denen es sich um Fibers handeln könnte, die äußere Membran passierten (Abb. III.28 B und C). Oft war zu beobachten, dass Markierungen an korrespondierenden Stellen in beiden Membranen auftraten; war zum Beispiel ein bestimmter Bereich der äußeren Membran markiert, konnte auch eine Markierung an der direkt darunter liegenden Stelle der Cytoplasmamembran detektiert werden (weiße Pfeile). Zur Kontrolle wurden ebenso Immunmarkierungen mit dem zugehörigen rabbit-Präimmunserum durchgeführt, allerdings konnten in diesen Versuchen keine Markierungen an den *Ignicoccus*-Zellen detektiert werden.

Da das erste Testserum des chicken anti-Igni_0668_{rek} Antikörpers nicht rechtzeitig vorlag, konnten bis zum Ende dieser Arbeit keine Co-Lokalisationsexperimente mit dem chicken anti-Igni_0668_{rek} Antikörper und dem rabbit anti-Iho670 Antikörper durchgeführt werden.

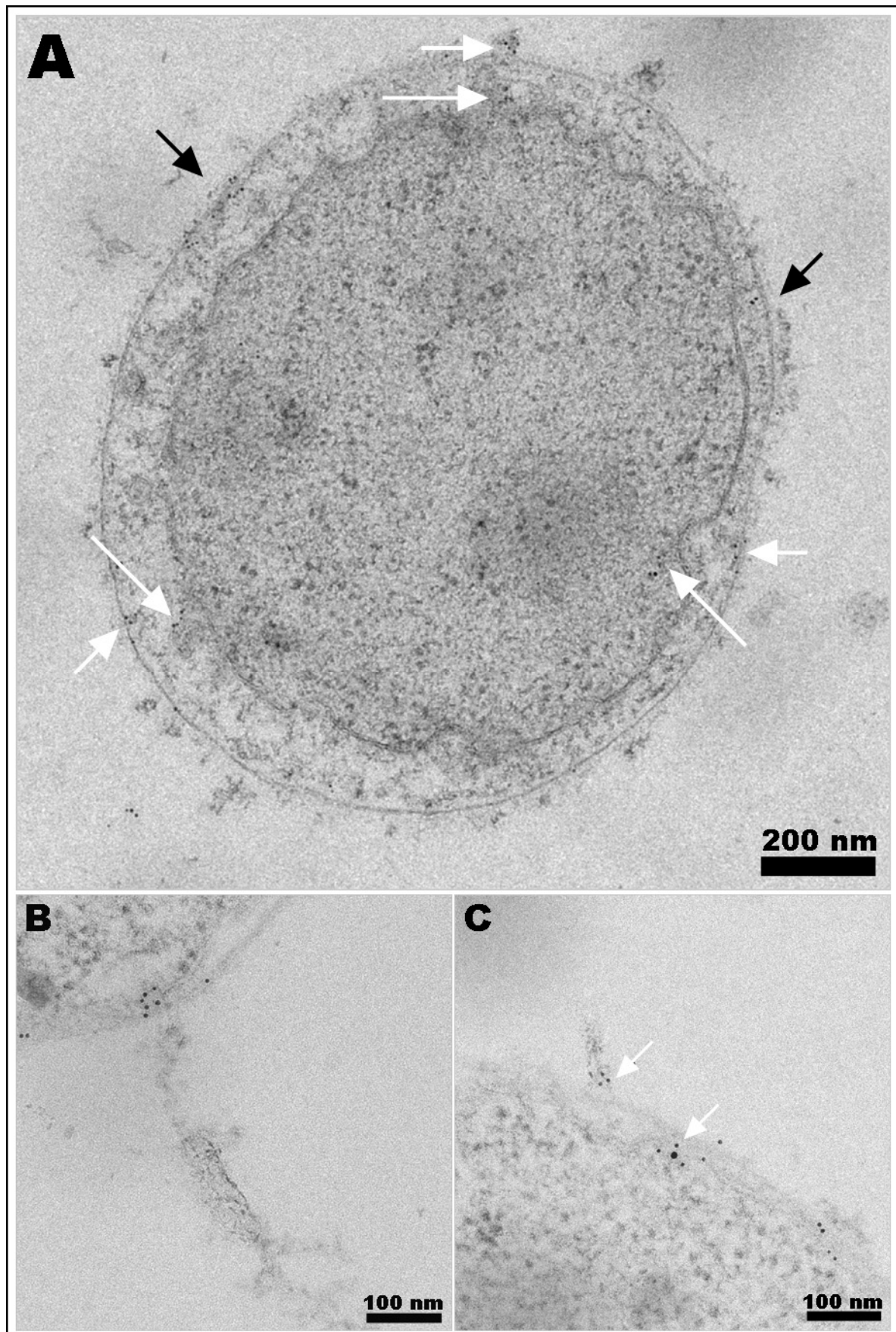


Abb. III.28: Immunmarkierung von *I. hospitalis* an Ultradünnschnitten, Präparation wie unter Kap. II.13.3 beschrieben, 1. Testserum rabbit anti-Ig_{ni}_0668_{rek} 1:50, sek. Antikörper goat anti-rabbit IgG + 6 nm Gold 1:10, Negativkontrastierung (incl. Kontrastverstärkung mit PbCi)

7 Polymerisationsstudien

Die rekombinant hergestellten Proteine Igni_0670_{rek1}, Igni_0670kurz_{rek1}, Igni_0670_{rek2} bzw. Igni_0670kurz_{rek2} wurden nach erfolgreicher Aufreinigung wie unter Kap. II.10 beschrieben in die Polymerisationsansätze eingesetzt und für unterschiedliche Zeiträume bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Das Polymerisationsverhalten wurde im Anschluss über Western Blots mit Hilfe des rabbit anti-Iho670 Antikörpers sowie elektronenmikroskopisch, über die Herstellung von Suspensionspräparaten, überprüft. Grundsätzlich konnten in allen Ansätzen Polymere der rekombinanten Fiberproteine per Western Blot nachgewiesen werden, egal ob es sich um die Konstrukte mit oder ohne den N-terminalen Bereich des Iho670-Proteins handelte. Bereits nach eintägiger Polymerisation waren Dimere auf den Blots nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Temperaturen von 4-37°C stellten sich als optimal für das Polymerisationsgeschehen heraus, dennoch konnten auch bei 60°C im Regelfall noch Polymere beobachtet werden. Eine Ausnahme bildeten die Polymerisationsansätze, die bei 90°C inkubiert wurden; hier konnten in Western Blots keine Polymere detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Weiterhin ergab sich zwischen den Ansätzen mit und ohne zweiwertige Ionen im Polymerisationsansatz kein Unterschied; sowohl mit als auch ohne die Zugabe von zweiwertigen Ionen konnten Polymere der Fiber-Proteine detektiert werden, was darauf schließen lässt, dass eine Zugabe von zweiwertigen Ionen keinen essentiellen Einfluss auf eine Polymerisation ausübt.

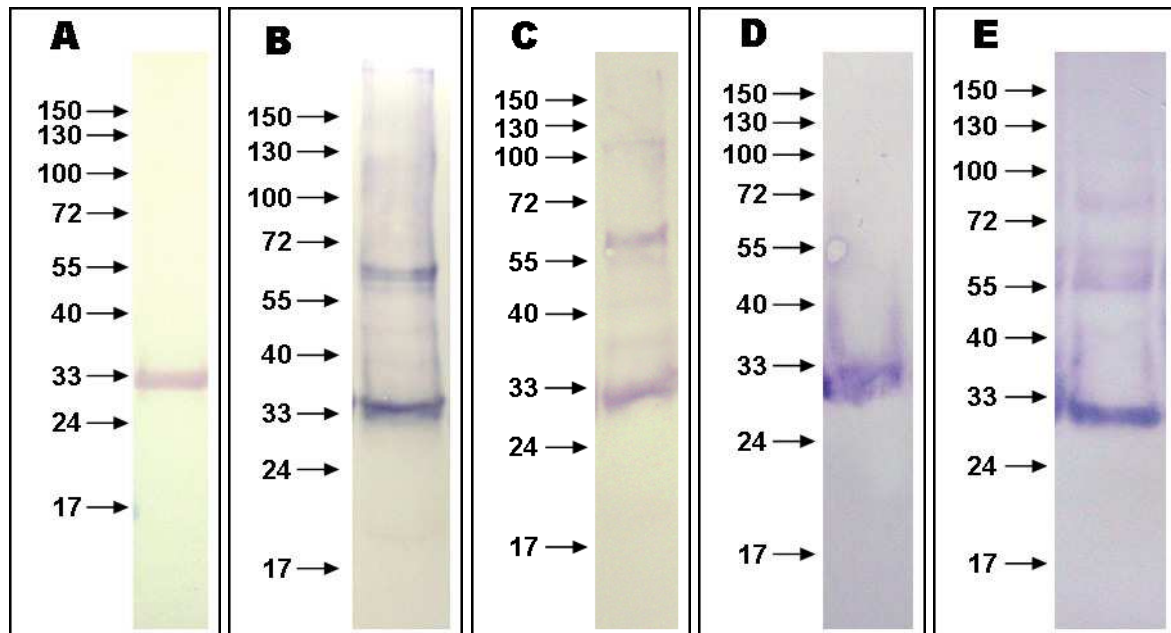


Abb. III.29: Western Blots verschiedener Polymerisationsansätze, A: Igni_0670_{rek1} direkt nach Aufreinigung; B: Igni_0670_{rek1} nach 3tägiger Polymerisation bei 37°C, Polymerisationsansatz; C: Igni_0670_{rek1} nach 3tägiger Polym. bei 37°C, Ansatz ohne zweiwertige Ionen im Polymerisationsansatz; D: Igni_0670kurz_{rek1} direkt nach Aufreinigung; E: Igni_0670kurz_{rek1} nach 3tägiger Polymerisation bei 37°C, Polymerisationsansatz; jeweils links: Proteinmassenstandard in kDa

Abb. III.29 A zeigt deutlich, dass in Ansätzen von Igni_0670_{rek1} direkt nach der Aufreinigung keine polymeren Formen des Proteins auftreten, es ist nur eine Bande bei ca. 35 kDa zu detektieren. Abb. III.29 B und C zeigen sowohl den Polymerisationsansatz als auch die Negativkontrolle ohne zweiwertige Ionen nach einer dreitägigen Inkubation bei 37°C. In beiden Blots sind eindeutig monomere als auch dimere Formen des Proteins bei ca. 70 kDa zu detektieren. Beide Blots zeigen außerdem Signale am oberen Ende des Trenngels. Zudem tritt in der Kontrolle ohne zweiwertige Ionen eine schwache Bande bei ca. 110 kDa auf, welche auf eine Oligomerisierung von Igni_0670_{rek1} in Form eines Tri- oder Tetramers hinweisen könnte.

Auch in Abb. III.29 D und E ist ein Vergleich zwischen Igni_0670kurz_{rek1}, dem Konstrukt ohne N-terminale Transmembranhelix, direkt nach der Aufreinigung sowie nach einer dreitägigen Polymerisation bei 37°C dargestellt. Wie bei dem vorher beschriebenen Konstrukt mit N-terminaler Helix ist auch hier direkt nach der Aufreinigung nur eine Bande bei 33 kDa zu detektieren, die die monomere Form des Igni_0670kurz_{rek1} Proteins anzeigt. Wird das Protein allerdings in den Polymerisationsansatz eingesetzt, können auch hier Banden bei ca. 65 kDa und 90 kDa detektiert werden, die eine Di- bzw. Trimerisierung des Proteins indizieren.

Längere Polymerisationszeiten hatten im Wesentlichen keinen Einfluss auf das Polymerisationsgeschehen. So waren auch nach 14tägiger Polymerisation prozentual nicht mehr Polymerbanden zu detektieren als nach einer 3tägigen Polymerisation. Auch war nie zu beobachten, dass die Banden bei 35 bzw. 33 kDa zugunsten von Banden höherer molekularer Masse komplett verschwanden. Vielmehr stellten sie in allen Fällen die dominierende Bande dar.

Die Ergebnisse, die mit den Konstrukten Igni_0670_{rek2} bzw. Igni_0670kurz_{rek2}, deren His-Tag durch einen Verdau mit Thrombin entfernt wurde, erzielt werden konnten, unterscheiden sich in einigen Punkten von den eben beschriebenen Ergebnissen. Es zeigte sich, dass diese Konstrukte ein scheinbar besseres Polymerisationsverhalten aufwiesen, da bereits direkt nach der Aufreinigung Polymere detektiert werden konnten. Auch in Bezug auf die Polymerisationseffizienz zeigten sich Unterschiede zu den Konstrukten mit dem C-terminalen His-Tag. So war im Besonderen bei dem Konstrukt Igni_0670kurz_{rek2} bereits kurz nach der Aufreinigung keine Bande mehr auf Höhe des monomeren Proteins zu detektieren.

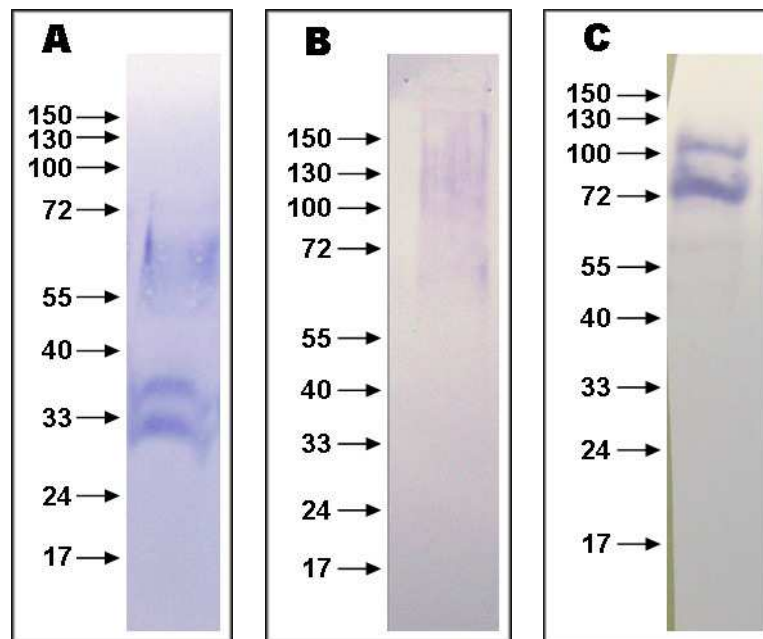


Abb. III.30: Western Blots verschiedener Polymerisationsansätze, A: Igni_0670_{rek2} direkt nach Aufreinigung; B: Igni_0670_{rek2} nach 3tägiger Polymerisation bei 37 °C; C: Igni_0670_{kurzrek2} direkt nach Aufreinigung; jeweils links: Proteinmassenstandard in kDa

Abb. III.30 A zeigt Igni_0670_{rek2} nach der Aufreinigung und nach dreitägiger Polymerisation bei 37°C. Bereits direkt nach der Aufreinigung kann eine Bande bei ca. 65 kDa detektiert werden, die eine dimere Form des Proteins darstellt. Zudem sind Banden bei ca. 35 kDa und 31 kDa zu detektieren, bei welchen es sich einerseits um das unverdaute, andererseits um das thrombinverdaute Igni_0670_{rek2}-Konstrukt handelt. Nach einer Polymerisation von 3 Tagen bei 37° zeigte sich keine Bande mehr im Bereich von 35-31 kDa, vielmehr konnte nur noch ein Schmier im höhermolekularen Bereich von 100-130 kDa sowie Signale im oberen Bereich des Trenngels detektiert werden. Auch bei dem Konstrukt Igni_0670_{kurzrek2}, dem im Gegensatz zu Igni_0670_{rek2} der N-terminale Bereich fehlt, können direkt nach der Aufreinigung höhermolekulare Banden bei ca. 60, 90 und 120 kDa detektiert werden; eine Bande bei ca. 30 kDa, die der des monomeren Proteins entsprechen würde, ist nicht mehr zu erkennen. Eine N-terminale Sequenzierung von auf PVDF-Membran geblotteten, Coomassie-gefärbten Proteinen bestätigte, dass es sich bei den detektierten polymeren Banden auch wirklich um Polymere des entsprechenden Igni_0670_{kurzrek2}-Proteins handelte. Die Analyse von Suspensionspräparaten der Polymerisationsansätze sollte zeigen, ob auch elektronenmikroskopisch polymere Formen der rekombinanten Iho670-Konstrukte nachweisbar sind. In folgender Abbildung sind einige der filamentösen Strukturen zu sehen, die im Zuge der Polymerisationsexperimente beobachtet werden konnten:

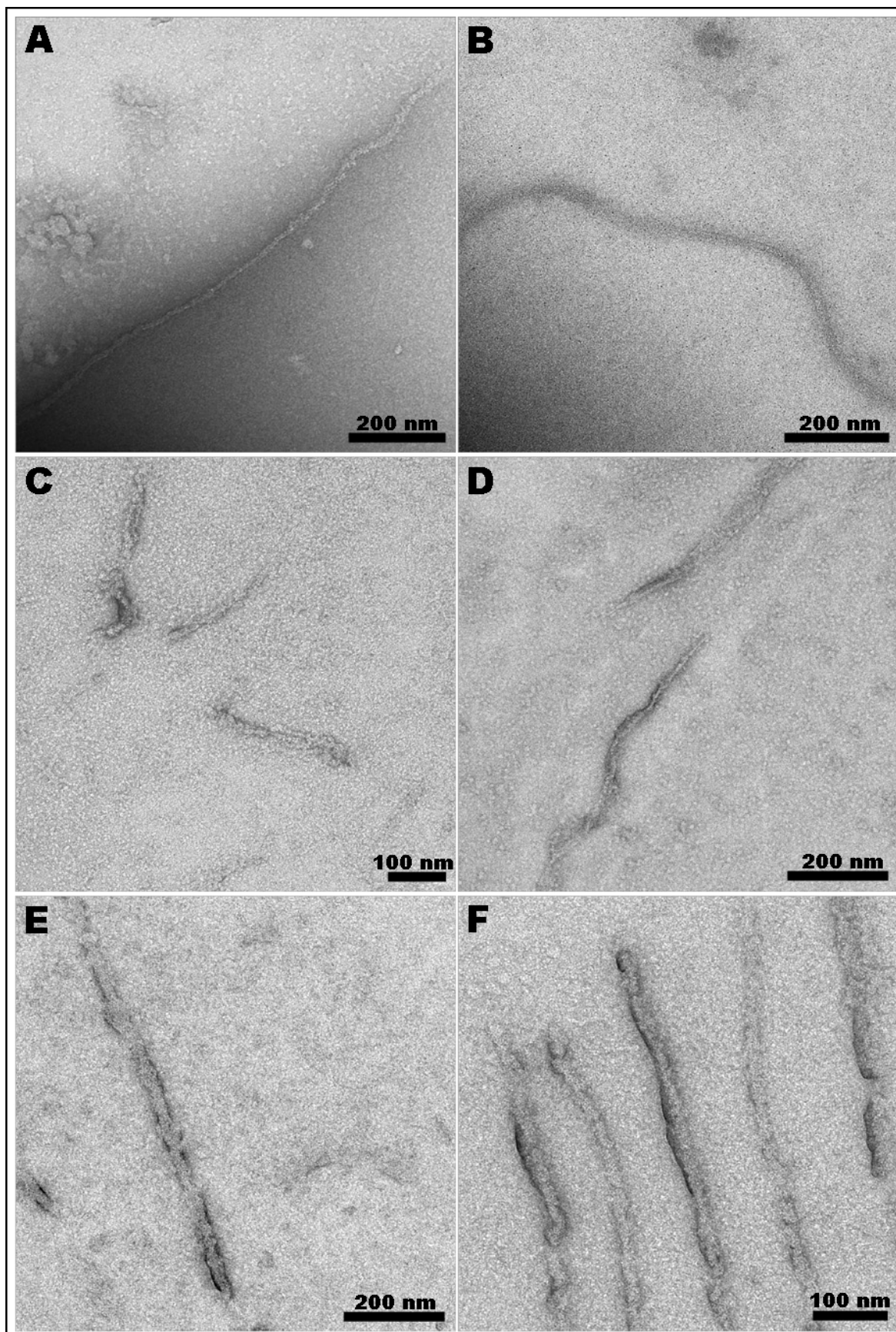


Abb. III.31: Suspensionspräparate verschiedener Polymerisationsansätze, alles Negativkontrastierungen, A: Igni_0670_{rek1} Polym. 3 Tage bei 37°C; B: Igni_0670_{rek1} Polym. 7 Tage bei 37°C; C: Igni_0670kurz_{rek1} Polym. 7 Tage bei 4°C; D: Igni_0670_{rek2} Polym. 3 Tage bei 4°C; E: Igni_0670kurz_{rek2} Polym. 3 Tage bei 4°C; F: Igni_0670_{rek2} Polym. 3 Tage bei 37°C

Abb. III.31 zeigt, dass im Zuge der elektronenmikroskopischen Auswertung in allen Ansätzen längliche Strukturen nachgewiesen werden konnten (vgl. Abb. III.31). Allerdings war das Auffinden von filamentösen Proteinaggregaten auf Polymerisationsansätze, die bei Temperaturen von 4°C, RT oder 37°C inkubiert wurden, begrenzt. Ansätze, die bei 60°C bzw. 90°C inkubiert wurden, ließen keine filamentösen Strukturen erkennen. Eine Inkubation für 3 oder 7 Tage ergab die besten Ergebnisse im Hinblick auf eine mögliche Polymerisation der Iho670-Konstrukte. Die hier gefundenen filamentösen Strukturen erinnern zwar an die Fiberfilamente von *I. hospitalis*, dennoch gibt es Abweichungen zum nativen Vorbild. So erscheinen die hier gefundenen Filamente weniger strukturiert; zudem ist keine klar erkennbare Längs- und Querstreifung zu beobachten.

Bezüglich der Länge der beobachteten Filamente konnte kein Zusammenhang mit einer längeren Inkubationszeit festgestellt werden. Bereits nach 3tägiger Inkubation konnten sowohl sehr kurze filamentöse Strukturen von ca. 100 nm Länge festgestellt werden, als auch Strukturen, die sich über mehrere µm erstreckten. Allerdings war die Konzentration der Filamente in allen Ansätzen relativ niedrig, was einer gründlichen Mikroskopie der Grids bedurfte. Im Durchschnitt zeigten die beobachteten Filamente Durchmesser von 10–16 nm, womit sie im Bereich der nativen Fibers von *I. hospitalis* liegen.

8 Cleavage Assay

Wie bereits in Müller *et al.* (2009) beschrieben, gibt das Fehlen der ersten sieben Aminosäuren im reifen Iho670-Protein einen Hinweis auf eine Prozessierung des Fiberproteins. Datenbankanalysen zeigten, dass es sich bei dem für die Prozessierung verantwortlichen Protein um Igni_1405 handeln könnte, welches Sequenzähnlichkeiten mit Prepilin Typ IV-Signalpeptidasen bzw. Proteinen der FlaK-Domäne aufweist. Mit Hilfe des unter Kap. II.12 beschriebenen Cleavage Assays wurde Igni_1405 *in vitro* auf eine mögliche Peptidaseaktivität untersucht. Das daraus resultierende Ergebnis ist in Abb. III.32 dargestellt:

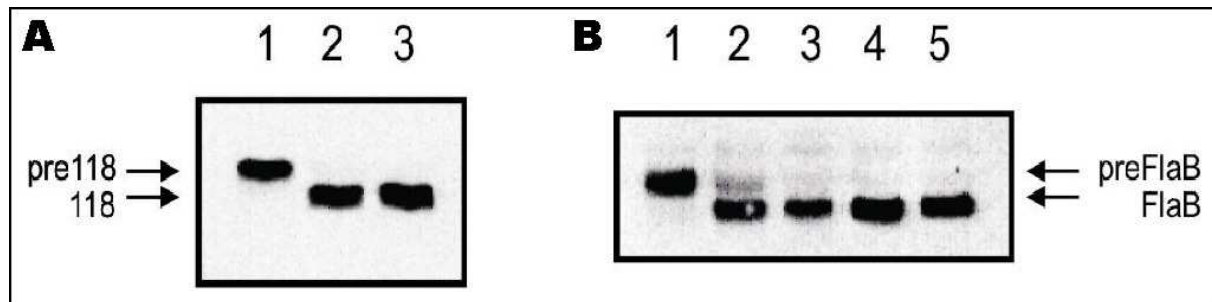


Abb. III.32: Cleavage Assays mit Igni_1405 als hypothetischer Peptidase, A: Cleavage Assay mit Sso_0118 (Pilin) als Substrat für Igni_1405, Spur 1: Kontrolle, Expression von Sso_0118 ohne Igni_1405; Spur 2: Expression von Sso_0118 vor Igni_1405-Induktion; Spur 3: Expression von Sso_0118 2 h nach Induktion von Igni_1405; B: Cleavage Assay mit FlaB als Substrat für PibD bzw. Igni_1405, Spur 1: Kontrolle, Expression von FlaB ohne Igni_1405 bzw. PibD; Spur 2: Expression von FlaB vor PibD-Induktion; Spur 3: Expression von FlaB 2 h nach Induktion von PibD; Spur 4: Expression von FlaB vor Igni_1405-Induktion; Spur 5: Expression von FlaB 2 h nach Induktion von Igni_1405; Abkürzungen: pre118: Sso_0118 als unprozessiertes *full length* Protein (mit Signalpeptid), 118: durch Peptidase prozessiertes pre118; preFlaB: FlaB als unprozessiertes *full length* Protein (mit Signalpeptid), FlaB: durch Peptidase prozessiertes preFlaB

Wie Abb. III.32 zeigt, ist Igni_1405 *in vitro* zur Prozessierung von Sso_0118 und FlaB in der Lage. Dies wird durch den Bandenshift deutlich, der zwischen den unprozessierten Pilinen/Flagellinen und den durch Igni_1405 prozessierten Pilinen/Flagellinen auftritt. Durch eine Abspaltung des Signalpeptids von preSso_0118 und preFlaB verringert sich die relative molekulare Masse des Proteins, was klar auf eine Peptidaseaktivität von Igni_1405 hinweist. Bereits vor der eigentlichen Induktion von Igni_1405 liegt praktisch das ganze Substrat, also preSso_0118 bzw. preFlaB, in prozessierter Form vor, was darauf schließen lässt, dass das als ‚Basalspiegel‘ gebildete Igni_1405 für eine vollständige Abspaltung des Signalpeptids der Substrate ausreicht. Der Ansatz, in welchem Igni_1405 durch die Peptidase PibD ersetzt ist, dient als Positivkontrolle. Auch hier reicht bereits das im Basalspiegel gebildete PibD für eine Prozessierung von preFlaB aus, jedoch erfolgt die Abspaltung des Signalpeptides nicht so effizient wie im Fall von Igni_1405.

9 Rekonstruktion des Fiberfilaments

Eine räumliche Rekonstruktion des nativen Fiberfilaments fand in Kooperation mit Prof. Edward H. Egelman von der Universität in Virginia statt. Zu diesem Zweck wurden, wie unter Kap. III.5 beschrieben, aufgereinigte Fibers von *I. hospitalis* in Lösung nach Virginia geschickt, wo die cryo-elektronenmikroskopische Analyse der Filamente sowie die Berechnung der dreidimensionalen Struktur der Filamente stattfanden. Zudem erfolgte eine Rekonstruktion anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen negativkontrastierter Filamente von *I. hospitalis* und *I. pacificus*, welche in Form von 16-bit TIFF-Files (1024 x

1024 Pixel) zur Analyse zur Verfügung gestellt wurden. Diese Aufnahmen zeichneten sich durch einen guten Erhalt der Filamente, eine sehr gute Schwermetallkontrastierung sowie dem Auftauchen von mehreren Reflexen im Fourier-Raum aus, die sich bei Maskierung von Filamentbereichen mit Hilfe der EM-Menü 4 Software zeigten. Die Fourier-Filterung diente dabei der Bestimmung von helikalen Periodizitäten, welche als Wiederholung von einander entsprechenden Abschnitten innerhalb helikaler Strukturen auftauchen. In der folgenden Abbildung sind zwei der Aufnahmen, welche für die dreidimensionale Rekonstruktion verwendet wurden, mit den zugehörigen Power-Spektren dargestellt.

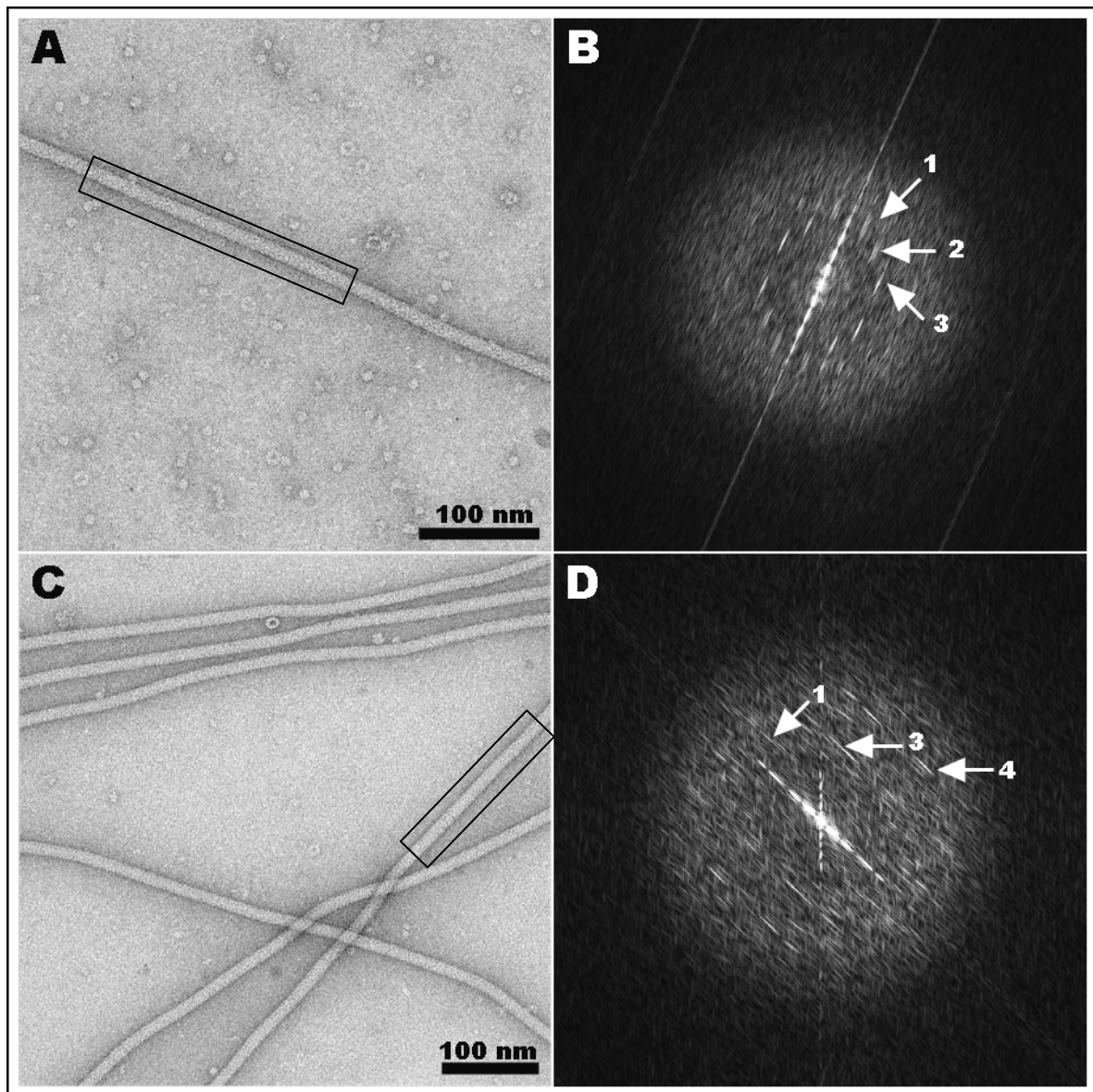


Abb. III.33: Aufnahmen schwermetallkontrastierter Filamente von A: *I. hospitalis* und C: *I. pacificus*; B: Fourier-Spektrum von Aufnahme A; D: Fourier-Spektrum von Aufnahme C; in A und C jeweils mit schwarzem Kasten markiert: Bereich der maskiert wurde, genauere Angaben zu Zahlen 1-4 in Fourier-Spektren siehe Text

Es konnten für die in Abb. III.33 B dargestellten Layer-Lines Frequenzen von $(4,2 \text{ nm})^{-1}$ (siehe weißer Pfeil Nr. 3); $(3,8 \text{ nm})^{-1}$ (siehe weißer Pfeil Nr. 2) und $(3,4 \text{ nm})^{-1}$ (siehe weißer Pfeil Nr. 1) bestimmt werden. Im Falle der Filamente von *I. pacificus* ergaben sich Werte von $(4,2 \text{ nm})^{-1}$ (siehe weißer Pfeil Nr. 3); $(3,4 \text{ nm})^{-1}$ (siehe weißer Pfeil Nr. 1) sowie $(2,6 \text{ nm})^{-1}$ (siehe weißer Pfeil Nr. 4).

Im Zuge einer dreidimensionalen Rekonstruktion anhand der oben gezeigten Bilder wurden insgesamt 14 Aufnahmen von schwermetallkontrastierten Filamenten an Prof. E. H. Egelman geschickt, der eine Rekonstruktion anhand des IHRSR-Algorithmus berechnete. Abb. III.34 stellt ein Ergebnis dieser Berechnung dar:

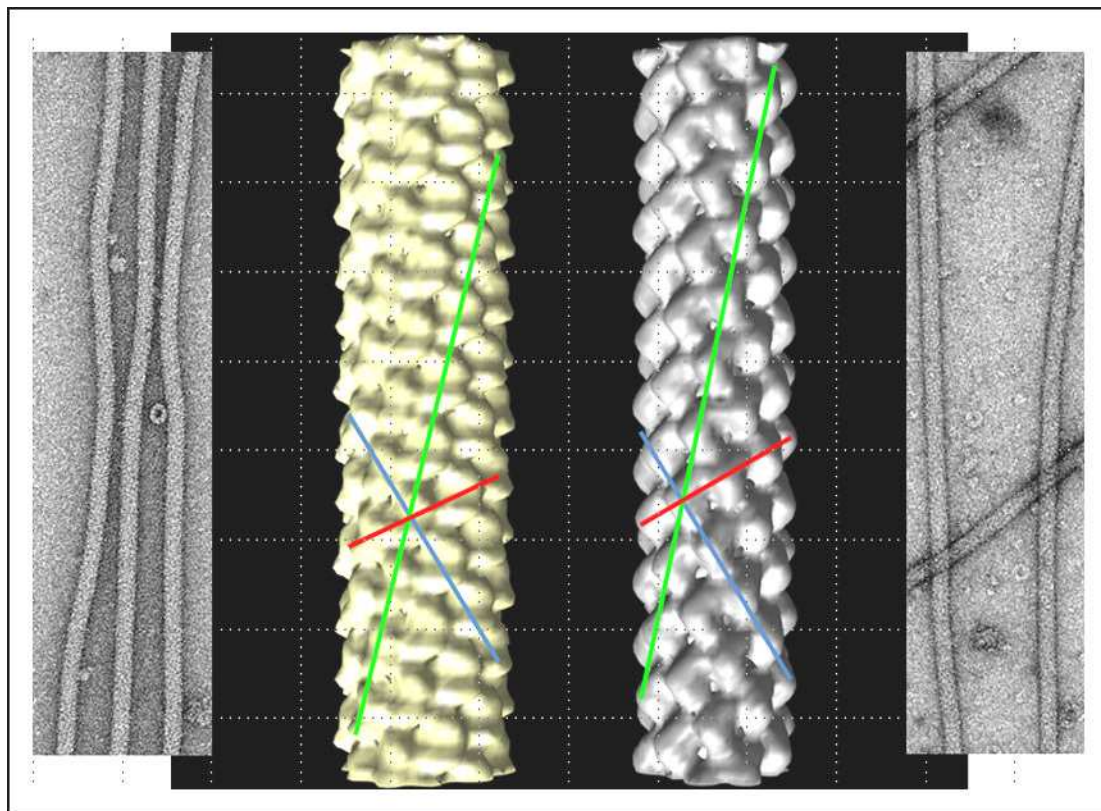


Abb. III.34: 3D-Rekonstruktion der Filamente von *I. pacificus* (Mitte links, gelb) und *I. hospitalis* (Mitte rechts, grau), jeweils seitlich: elektronenmikroskopischen Aufnahmen von negativkontrastierten Filamenten von *I. pacificus* (links) und *I. hospitalis* (rechts), rote, grüne und blaue Balken: Darstellung der prominenten Helices

Dabei wurde das Modell des *I. pacificus*-Filaments aus einem Bild mit insgesamt sechs Filamenten berechnet (vgl. Abb. III.33), das Modell des Fiberfilaments von *I. hospitalis* dagegen aus sechs verschiedenen Aufnahmen mit mehreren Fibers. Die Pixelgröße der Bilder, welche für die in Abb. III.34 dargestellten Rekonstruktionen verwendet wurden, lag bei allen Aufnahmen bei 0,58 nm.

Sind doch die Filamente der beiden *Ignicoccus*-Arten in negativkontrastierten EM-Aufnahmen nicht zu unterscheiden (vgl. Abb. III.34 seitliche Aufnahmen), erscheinen die

Rekonstruktionen der Filamente beider Organismen bereits auf den ersten Blick deutlich unterschiedlich. Die Rekonstruktion des *I. hospitalis*-Filaments erscheint viel gleichmäßiger als das Filament von *I. pacificus*, welches auf seiner Oberfläche zahlreiche Mulden bzw. Einkerbungen aufweist. Dennoch ergeben sich in Bezug auf die Symmetrien der beiden Filamente ähnliche Werte. So konnte für das Model der Fiber von *I. hospitalis* eine Rotation der Untereinheiten von 107° sowie ein axialer Anstieg von $5,2 \text{ \AA}$ ermittelt werden. In Bezug auf das Filament von *I. pacificus* konnten lediglich eine Abweichung der Rotation der Untereinheiten von $0,1^\circ$ bzw. eine Abweichung von $0,1 \text{ \AA}$ im Hinblick auf dessen axialen Anstieg ermittelt werden.

In Abb. III.35 und Abb. III.36 sind die gemittelten Fourier-Spektren beider Filamentrekonstruktionen sowie deren Querschnitte dargestellt, welche Hinweise auf verschiedene Symmetrien innerhalb der Filamente geben.

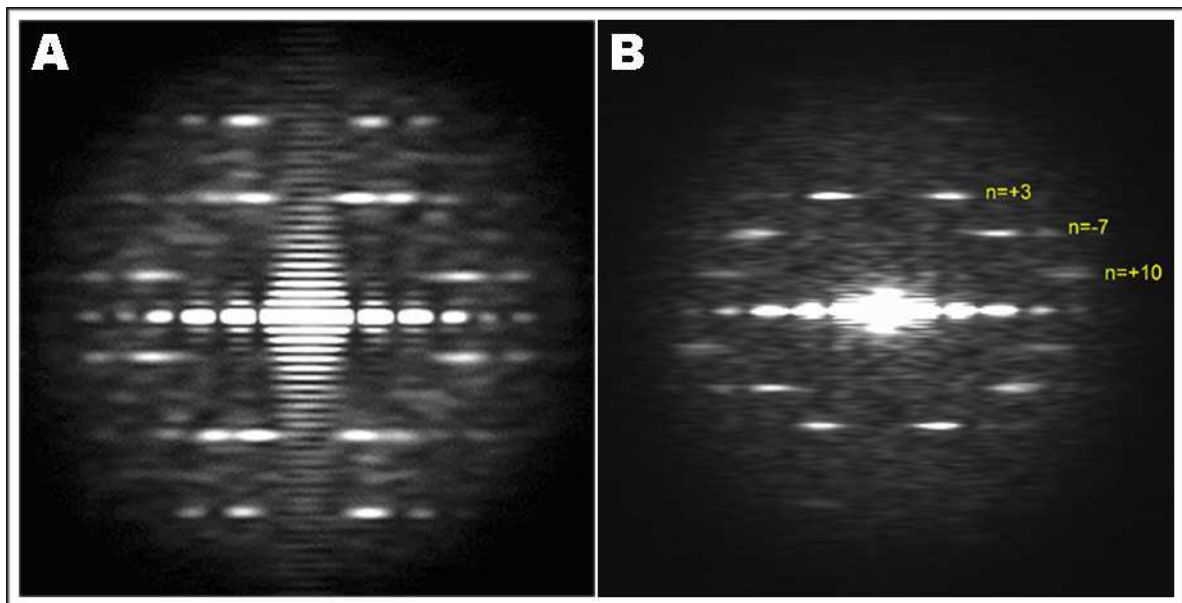


Abb. III.35: gemittelte Fourier-Spektren der Filamente von A: *I. pacificus* und B: *I. hospitalis* (mit indizierten Layer-Lines in gelb)

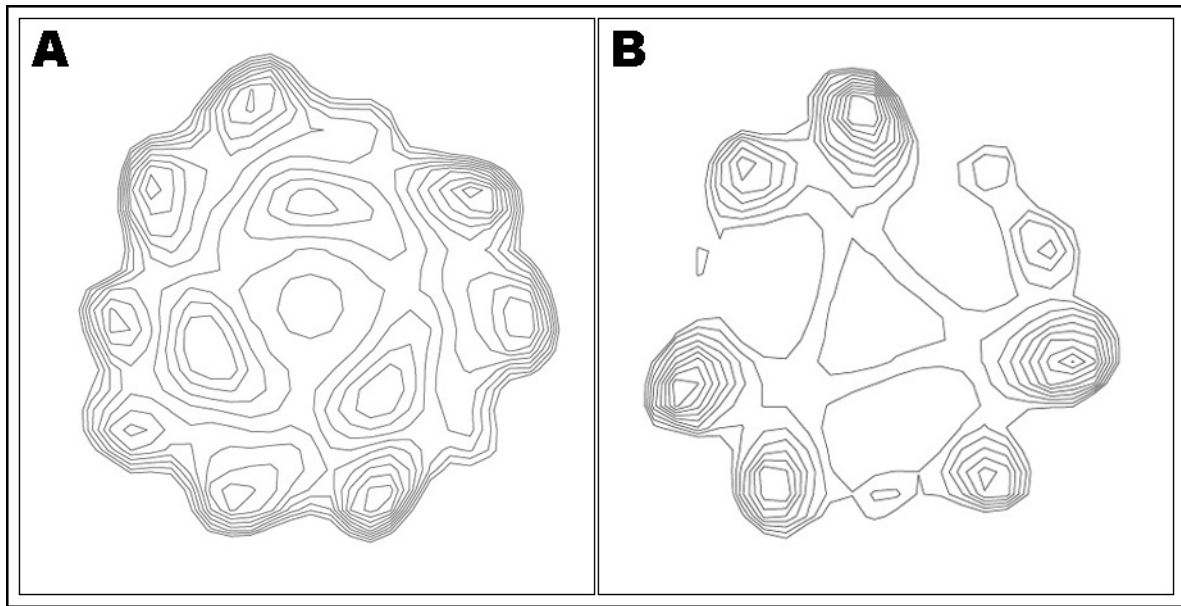


Abb. III.36: Querschnitt durch die rekonstruierten Filamente von A: *I. pacificus* und B: *I. hospitalis*

So konnten im Fall des Power-Spektrums von *I. hospitalis* die Layer-Linien von Prof. E. H. Egelman folgenden Bessel-Ordnungen zugeordnet werden (-: linksgängig, +: rechtsgängig, vgl. Abb. III.35 B): die Layer-Linie in der Nähe des Äquators wurde als eben angesehen und mit $n=+10$ benannt. Bei der darüber liegenden Linie handelte es sich um eine ungeradzahlige Symmetrie, welche mit $n=-7$ beschrieben wurde. Auch bei der obersten Layer-Linie konnte eine ungeradzahlige Symmetrie ermittelt werden, die mit $n=+3$ indiziert wurde. Diese Werte weisen auf drei Symmetrien innerhalb des Filaments von *I. hospitalis* hin, welche in Abb. III.34 durch verschiedenfarbige Linien dargestellt wurden. Diese Symmetrien werden einerseits von einer siebenzähligen, linksgängigen Helix (Abb. III.34 blaue Linie) beschrieben, des Weiteren durch eine rechtsgängige, dreizählige (Abb. III.34 rote Linie) bzw. eine rechtsgängige, zehnzählige Helix (Abb. III.34 grüne Linie). Die stärkste Layer-Line ist dabei die Linie, die mit $n=+3$ beschrieben wurde, was die stärkste Konnektivität der Proteinuntereinheiten innerhalb dieser dreisträngigen, rechtsgewundenen Helix anzeigt. Die zweitstärkste Konnektivität herrscht demzufolge in der linksgewundenen siebenzähligen Helix, gefolgt von der schwächsten Verbindung der Untereinheiten innerhalb der zehnsträngigen Helix. Laut Aussage von Prof. E. H. Egelman gibt es keine Zweifel an den soeben beschriebenen Symmetrien an sich (zehn-, sieben- oder dreizählig), allerdings könnte es sich um umgekehrte Helixgängigkeiten handeln.

Bei Betrachtung des gemittelten Fourier-Spektrums des *I. pacificus*-Filaments können ähnliche Symmetrien vermutet werden, welche ebenfalls durch verschiedenfarbige Linien in Abb. III.34 dargestellt wurden. Allerdings gibt bereits die sehr schwach ausgebildete Layer-Line bei $n=-7$ einen Hinweis darauf, dass diese Symmetrie durch eine viel geringere Konnektivität der Untereinheiten gekennzeichnet ist. Zudem ist klar die Existenz von Reflexen höherer Ordnung zu erkennen, welche in dem gemittelten Fourier-Spektrum der *I.*

hospitalis-Filamente nicht zu erkennen sind. Dies spricht für deutliche Unterschiede in der Ultrastruktur beider Filamente.

Betrachtet man den Querschnitt der dreidimensionalen Rekonstruktion des Fiberfilaments von *I. hospitalis* (Abb. III.36 B), erkennt man die Existenz eines zentralen, dreigängigen Filamentkerns sowie globuläre, kugelige Ausbuchtungen mit größerem Radius im äußeren Filamentbereich. Auch in diesem Querschnitt wird die Konnektivität zwischen den Proteinuntereinheiten dargestellt, sichtbar durch die Verbindungen zwischen den einzelnen globulären Domänen. Der Querschnitt des Filaments von *I. pacificus* weist ebenfalls globuläre Ausbuchtungen auf, unterscheidet sich aber dennoch stark von dem des *I. hospitalis*-Filaments. Auch hier kann die Konnektivität der Untereinheiten durch die starken Interaktionen der globulären Domänen untereinander erkannt werden.

Um eine verbesserte Darstellung mit höherer Auflösung zu erzielen, wurden im weiteren Verlauf Aufnahmen von negativkontrastierten Fibers von *I. hospitalis* analysiert, welche eine Pixelgröße von 0,46 nm aufwiesen. Das Ergebnis der Berechnung unter Zuhilfenahme des IHRSR-Algorithmus ist in Abb. III.37 dargestellt:

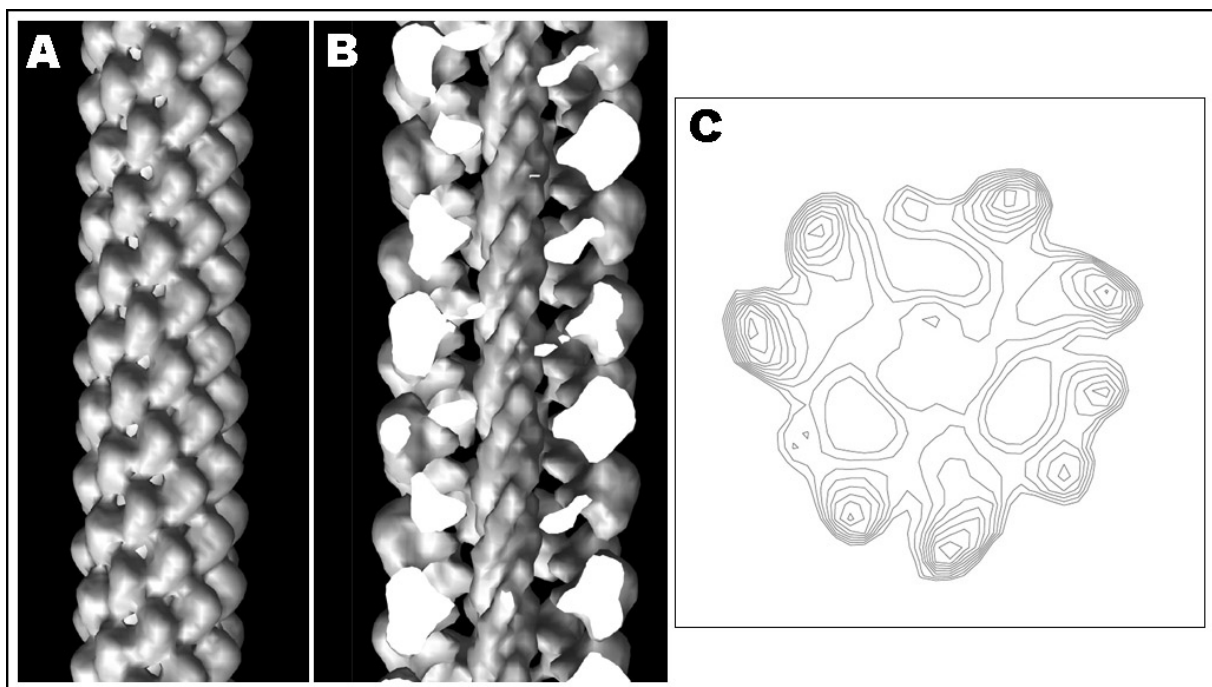


Abb. III.37: 3D-Rekonstruktion des Fiberfilaments von *I. hospitalis*, berechnet aus negativkontrastierten Aufnahmen mit einer Pixelgröße von 0,46 nm; A: Seitenansicht; B: Sicht auf den zentralen Kern, Oberfläche der Vorderansicht wurde digital entfernt; C: Querschnitt durch das rekonstruierte Filament

Wie Abb. III.37 zeigt, weist die Rekonstruktion der Bilder mit einer Pixelgröße von 0,46 nm eine deutliche Verbesserung der Auflösung auf. Auch hier sind die drei Helices, rechtsgängig und drei- bzw. zehnzählig oder linksgängig und siebenzählig, zu erkennen. Zudem zeigt der Blick in den zentralen Part des Filaments (Abb. III.37 B) eine Struktur, die durch α -helikale

Ausläufer gebildet werden könnte (E. H. Egelman, persönliche Mitteilung). Dies wird durch den in Abb. III.37 C dargestellten Querschnitt dieser Rekonstruktion gestützt, welcher ebenfalls eine zentrale Dichtigkeit in diesem Bereich aufweist. Zudem ist auch hier eine ca. dreizählige Symmetrie des zentralen Bereiches sowie eine eindeutige Interaktion der globulären Untereinheiten zu erkennen.

Da Rekonstruktionen an negativkontrastierten Präparaten stets präparationsbedingten Limitationen wie Dehydratisierung, einer damit einhergehenden Abflachung der Strukturen und einer Veränderung der Präparate durch die Negativkontrastierung an sich unterworfen sind, wurden zudem Rekonstruktionen von unkontrastierten, gefroren-hydratisierten Fibers von *I. hospitalis* berechnet. Eine dieser Rekonstruktionen ist in Abb. III.38 dargestellt:

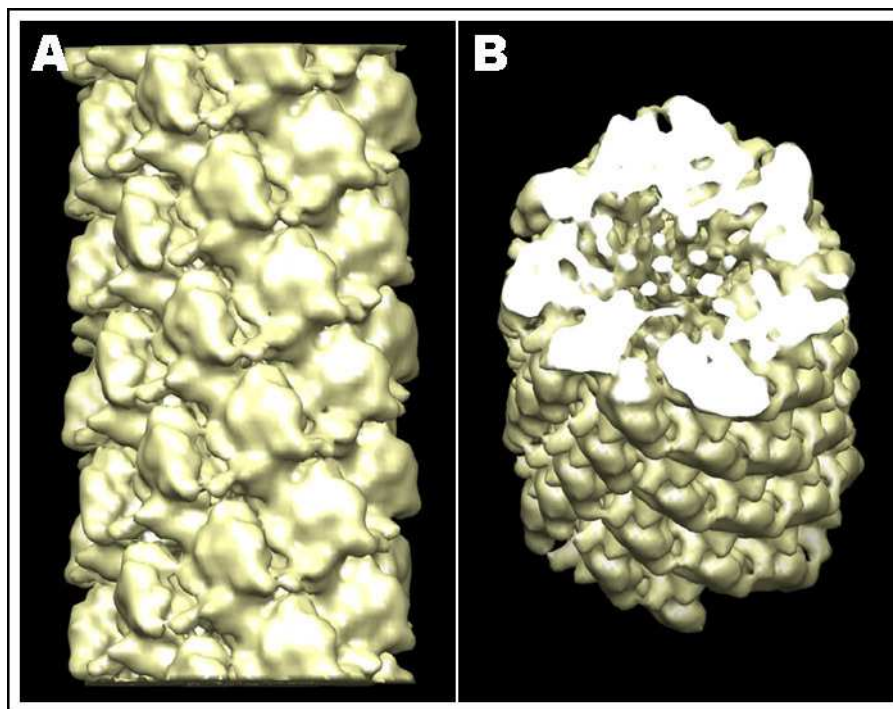


Abb. III.38: 3D-Rekonstruktion des Fiberfilaments von *I. hospitalis*, berechnet aus cryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen, Auflösung: 8 Å; A: Vorderansicht; B: Ansicht von oben

Das in dieser Abbildung dargestellte, dreidimensional rekonstruierte Filament von *I. hospitalis* weist eine Auflösung von ca. 8 Å auf und zeigt daher deutlich mehr Details als die Rekonstruktionen, die anhand der negativkontrastierten Aufnahmen dieser Fibers erzielt werden konnten. Erschien die Oberfläche der rekonstruierten Filamente aus den negativkontrastierten EM-Bildern als relativ glatt und gleichmäßig, zeigt diese Rekonstruktion eine Oberfläche, die von Furchen und Kerben gekennzeichnet ist. Die einzelnen Untereinheiten sind nicht lediglich als kugelige Ausbuchtungen dargestellt, sondern weisen eine deutlich höhere Komplexität innerhalb der cryo-elektronenmikroskopischen Rekonstruktion auf. Auch hier sind die bereits zuvor erwähnten Symmetrien zu erkennen. Wie in Abb. III.34 bzw. III.37 erkennt man neben den rechtsgängigen drei- bzw. zehnzähligen Helices ebenso

eine linksgängige, siebenzählige Helix, wobei die größte Konnektivität wiederum zwischen den Untereinheiten innerhalb der rechtsgängigen, dreizähligen Helix vorherrscht. Wie Abb. III.38 B zeigt, weist das Filament auch in dieser Rekonstruktion stabförmige Strukturen innerhalb des zentralen Bereiches auf, welche von α -helikalem Ursprung sind (E. H. Egelman, persönliche Mitteilung; vgl. Abb. III.37 B). Die mögliche Existenz solcher α -helikaler Bereiche wurde bereits durch diverse Vorhersageprogramme erkannt (vgl. Tab. III.3, Kap. III.6.1).

Im nächsten Schritt sollte durch eine weitere Erhöhung der Auflösung die Möglichkeit geschaffen werden, die absolute Gängigkeit der Helices der Iho670 Untereinheiten zu erkennen. Dies sollte dadurch erzielt werden, dass das atomare Model des N-terminalen Bereiches, welcher eine α -Helix beschreibt, in die Rekonstruktion der Kernregion eingepasst wird. Durch die Tatsache, dass α -Helices in Proteinen grundsätzlich rechtsgängig sind, kann man auf die tatsächliche Gängigkeit der Helix der Iho670 Untereinheiten schließen, wenn das atomare Model der N-terminalen α -Helix der Kernregion in diesen rekonstruierten Filamentbereich passt. Würde das atomare Model dieses Bereiches nicht in das rekonstruierte Filament passen, muss eine umgekehrte Gängigkeit der Proteinuntereinheiten vorausgesetzt werden. In Abb. III.39 ist ein Model des *I. hospitalis*-Filaments bei einer Auflösung von ca. 7 Å dargestellt. Zusätzlich zeigt sie eine Rekonstruktion des zentralen Parts des Filaments, in welches mehrere atomare Modelle des N-terminalen Bereichs des Iho670-Proteins eingepasst wurden.

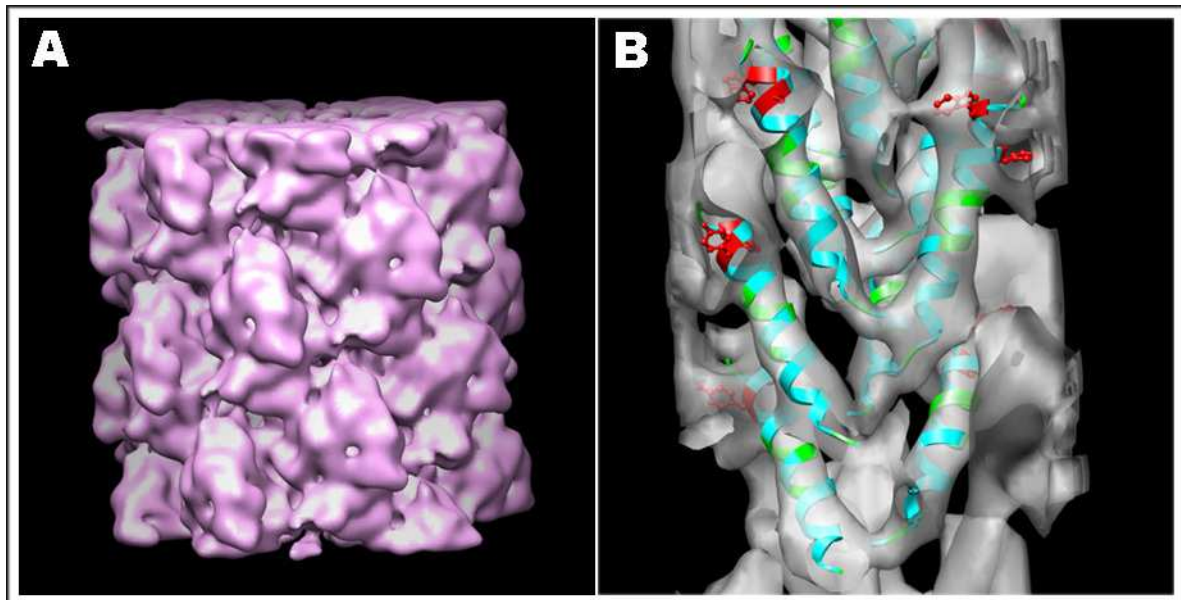


Abb. III.39: 3D-Rekonstruktion des Fiberfilaments von *I. hospitalis*, berechnet aus cryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen, Auflösung: ca. 7 Å; A: Vorderansicht; B: Ansicht des zentralen Kerns, atomare Modelle des N-terminalen, α -helikalen Bereiches des Iho670-Proteins wurden digital eingepasst

Dabei ist in Abb. III.39 B klar erkennbar, dass die atomaren Modelle der N-terminalen α -Helix des Iho670-Proteins in das berechnete Model des zentralen Filamentkerns passen, was die bisher angenommenen Helixgängigkeiten bestätigte. Da die ersten vier Aminosäuren VSPV ungeordnet zu sein scheinen, wurden sie für das atomare Model nicht berücksichtigt (E. H. Egelman, persönliche Mitteilung). Zur besseren Orientierung wurden die aromatischen Aminosäuren Tyrosin (Position 29 in Iho670) und Tryptophan (Position 31 in Iho670) in rot dargestellt, die Aminosäure Alanin wurde mit grün gekennzeichnet.

Zusammenfassend betrachtet zeigt das hier gezeigte, rekonstruierte Filament einen Aufbau, der durch eine dominante dreizählige, rechtsgewundenen Helix gekennzeichnet ist. Zudem kommt es zu starken Interaktionen der Untereinheiten entlang einer linksgewundenen, siebenzähligen sowie einer rechtsgewundenen, zehnzähligen Helix. Der zentrale Bereich ist durch starke Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben N-terminalen Bereichen der Iho670-Proteine gekennzeichnet, welche innerhalb des Filaments eine Art Rückgrat bilden. Eine Interpretation dieser Ergebnisse sowie Vergleiche mit bereits veröffentlichten Rekonstruktionen verschiedener bakterieller und archaeeller Filamentstrukturen werden ausführlich in der Diskussion behandelt.

IV Diskussion

1 Lokalisation der Fiberproteine über immunologische Methoden

Um Zellanhänge von *I. hospitalis* selektiv anzureichern, wurde der Fermentationsüberstand einer PEG/NaCl-Fällung unterzogen. Das dabei entstandene Präzipitat wurde über eine bzw. mehrere Dichtegradienten-Zentrifugationen aufgetrennt, die entstandenen Banden gezapft und einzeln analysiert. Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Immunlokalisationsstudien mit dem polyklonalen rabbit anti-Iho670 Antikörper durchgeführt, um die Verteilung und Lokalisation des Fiberproteins Iho670 zu untersuchen. Dabei wurden einerseits Iho670-Epitope in Western Blot Analysen markiert, andererseits diese Epitope in elektronenmikroskopischen Präparaten lokalisiert. Zudem erfolgte eine Immunmarkierung an in Cellulosekapillaren kultivierten, hochdruckgefrorenen und gefriersubstituierten *I. hospitalis*-Zellen nach einer Einbettung in das Kunstharz Epon.

1.1 Immunmarkierung an Western Blots

Die Ergebnisse der Immunmarkierungsexperimente an Western Blots lassen eindeutig auf eine spezifische Interaktion des rabbit anti-Iho670 Antikörpers mit Epitopen des dominierenden Fiberproteins Iho670 schließen (vgl. Kap. III.2.1). Nach vollständiger Hitze-denaturierung von Proteinen aus stark verunreinigten Fraktionen, die im Zuge der Fiber-aufreinigung über CsCl-Gradientenzentrifugation von PEG/NaCl-gefälltem Fermentationsüberstand erhalten wurden, konnte stets eine dominierende Bande auf einer Höhe von ca. 33 kDa markiert werden. Vergleiche der Laufhöhe dieser markierten Proteinbande bei 33 kDa mit in SDS-Gelen analysierten Proteinbanden von gut aufgereinigten Fibers, die ebenfalls bei 33 kDa lokalisiert werden konnten, induzieren klar eine spezifische Markierung des Fiberproteins Iho670, welches bereits in Müller *et al.* (2009) als Hauptprotein der Fibers von *I. hospitalis* identifiziert werden konnte. Western Blot Analysen, in welchen der rabbit anti-Iho670 Antikörper durch das Präimmunserum ersetzt wurde, zeigten keine Reaktion, was auf spezifische Bindungseigenschaften des Antikörpers schließen lässt. In zahlreichen Fällen konnten neben der klar markierten Bande bei 33 kDa zusätzlich Signale in höher-molekularen Bereichen von ca. 65, 100 und 130 kDa detektiert werden. Diese stellen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit Oligomere des Iho670-Proteins dar, die durch unvollständige Denaturierung in einer dimeren, trimeren oder tetrameren Form erhalten blieben. Bereits in Müller *et al.* (2009) wird auf ein derartiges Verhalten des Iho670-Proteins hingewiesen. So konnten die Autoren dort in SDS-Gelen nach unzureichender Hitzedenaturierung der Fibers

Proteinbanden bei 60, 90, 120 und 180 kDa anfärben, welche als oligomere Formen des Iho670-Proteins vermutet wurden.

1.2 Immunmarkierung der Fibers in Lösung und auf bewachsenen, kohlebeschichteten Goldgrids

Neben einer Immunlokalisation an Western Blots wurde das Iho670-Protein an elektronenmikroskopischen Präparaten detektiert. Dabei wurde in ersten Versuchen eine Lokalisation an aufgereinigten Fibers in Lösung angestrebt (vgl. Kap. III.2.2), welche bevorzugt Antikörpersignale an den Anfangs- bzw. Endpunkten der Iho670 Fibers offenbarten. Diese Ergebnisse zeigen, dass der polyklonale rabbit anti-Iho670 Antikörper primär Epitope erkennt, die nicht auf der Oberfläche der Fibers exponiert vorliegen, sondern vielmehr an innen gelegenen Fiberbereichen präsentiert werden. Die Ursache dieses Bindungsverhaltens liegt wohl in der Aufreinigung der Fibers, welche zur Antikörpergenerierung eingesetzt wurden, begründet. Um polyklonale Antikörper gegen das Iho670-Protein zu erhalten, wurden die Fibers von *I. hospitalis* über zahlreiche Zentrifugationsschritte, eine Dialyse sowie über eine Gelfiltration aufgereinigt (R. Wirth, persönliche Mitteilung), bevor die dabei erhaltene Proteinlösung von der Firma Davids (Burgweinting) zur Antikörperherstellung in Kaninchen verwendet wurde. Dabei ist davon auszugehen, dass die Fibers durch die Aufreinigungsprozedur bereits in einem stark fragmentierten Zustand vorlagen, welcher auf die verschiedenen Zentrifugationsschritte zurückzuführen ist. Es ist also wahrscheinlich, dass diese Fibers andere Epitope auf ihrer Oberfläche präsentieren als im nativen Zustand. Folglich werden im Kaninchen auch polyklonale Antikörper generiert, die gegen diese Epitope gerichtet sind, welche aber möglicherweise in der nativen Fiber nicht auf deren Oberfläche exponiert vorliegen. Genau dieses Phänomen kann an den in Abb. III.6 gezeigten, immunmarkierten Fibers von *I. hospitalis* beobachtet werden. Es kommt primär an solchen Stellen zu einer Antigen-Antikörper Reaktion, an denen die Fiber mechanische Beschädigungen aufweist und der Antikörper Zugang zu innen liegenden Epitopen der Filamentstruktur hat. Diese mechanischen Beschädigungen sind dabei auch hier das Resultat verschiedener Zentrifugations- und Resuspendierungsschritte, durch welche es zu einer Fragmentierung in immer kleinere Filamentabschnitte kommt.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde versucht, eine effizientere Immunmarkierungsmethode zu etablieren, die die Präsenz des Iho670-Proteins über die gesamte Länge des Filaments nachweist. Zu diesem Zweck wurden mit *I. hospitalis* bewachsene, kohlebeschichtete Goldgrids einer Immunmarkierung mit dem rabbit anti-Iho670 Antikörper unterzogen. Um Epitope, an welche der Iho670 Antikörper binden kann, zu generieren, wurden die Grids bei 120°C inkubiert. Durch diese modifizierte Art der Hitzefixierung sollten

die Fiberproteine partiell denaturiert und somit dem Antikörper zugänglich gemacht werden. Abb. III.7 zeigt dabei einen Vergleich zwischen einer Immunmarkierung mit und ohne Hitzedenaturierungsschritt. Dabei sind in dem Versuchsansatz ohne Hitzedenaturierung durchaus Antikörpersignale über die gesamte Filamentlänge zu verzeichnen, allerdings sind diese Signale sehr unregelmäßig und oft weit voneinander entfernt. Zudem ist eine hohe Hintergrundverschmutzung zu beobachten. Da es sich bei Aufwuchsversuchen auf kohlebeschichteten Goldgrids um eine sehr schonende Präparationsmethode handelt, bei der keinerlei Zentrifugations- oder Resuspendierungsschritte nötig sind, ist davon auszugehen, dass die Fibers im Gegensatz zu der Immunmarkierungsmethode der Filamente in Lösung weitestgehend unbeschädigt erhalten bleiben. Dadurch können nur sehr wenige Antikörper direkt an die Fibers binden, da nur eine geringe Anzahl von Epitopen zugänglich ist. Die hohe Hintergrundverschmutzung ist wohl darauf zurückzuführen, dass einzelne Iho670-Proteine auf der gesamten Oberfläche der bewachsenen Goldgrids vorliegen (Y.-D. Stierhof, persönliche Mitteilung). Dies erscheint durchaus realistisch, da bewachsene, kohlebeschichtete Goldgrids eine enorme Anzahl von Fibers über die gesamte Oberfläche zeigen. Somit würden die Signale im Hintergrund keine Hintergrundverschmutzung, sondern Markierungen von einzelnen, unpolymerisierten Iho670-Proteinen bzw. sehr kurzen Filamentbereichen darstellen.

Eine Immunmarkierung von bewachsenen, kohlebeschichteten Goldgrids nach Durchführung eines Hitzeschritts im Vorfeld der Immunmarkierung löst die eben angesprochenen Probleme. So können auf diesen Grids einerseits deutlich weniger Hintergrundsignale detektiert werden, andererseits zeigen die Fibers gleichmäßig verteilte Signale über die gesamte Filamentlänge. Durch die Inkubation der bewachsenen Grids bei trockener Hitze kommt es dabei zu einer partiellen Denaturierung der Iho670-Proteine innerhalb der Fiberstruktur, so dass Epitope, die unter normalen Umständen in der Filamentstruktur verborgen sind, zugänglich werden und von den polyklonalen Iho670 Antikörpern erkannt und gebunden werden können. Ähnliche Beobachtungen konnten bereits im Zusammenhang mit verborgenen Epitopen in Transthyretin (TTR) gemacht werden (Goldsteins *et al.*, 1999). Bei TTR handelt es sich um ein Serumprotein von Wirbeltieren, welches am Transport von Schilddrüsenhormonen beteiligt ist. TTR kann unter bestimmten Umständen Fibrillen bilden, welche sich in Form von unlöslichen Aggregaten in Interstitium von Zellen ablagern können und als Amyloid bezeichnet werden (Cornwell *et al.*, 1988). Goldsteins *et al.* (1999) konnten durch unterschiedliche Denaturierungsschritte verborgene Epitope in Wildtyp-TTR freilegen, welche im Anschluss einer Immunmarkierung mit bestimmten Antikörpern zugänglich waren. Wurde in diesen Versuchen auf eine Denaturierung verzichtet, fand keine Antigen-Antikörper-Reaktion und folglich keine Markierung der TTR-Proteine statt. Auch bei Vitronektin, einem der am häufigsten vorkommenden adhäsiven Glykoproteine im Blut,

konnten verborgene Epitope durch Hitzebehandlung freigelegt werden (Seiffert und Smith, 1997). So zeigte aufgereinigtes, natives Vitronektin in diesen Versuchen eine mindestens 50fach geringere Bindungsaffinität zu den in dieser Studie verwendeten Antikörpern als im Falle einer Verwendung von hitzedenaturiertem Vitronektin.

Auch die Reduzierung der Hintergrundverschmutzung nach Durchführung des Hitzeschrittes auf bewachsenen Goldgrids ist erklärbar. Seit langem ist bekannt, dass hyperthermophile Organismen zahlreiche Strategien entwickelt haben, um die hohen Temperaturen, die in ihrer Umgebung vorherrschen, unbeschadet zu überdauern (Ladenstein und Antranikian, 1998; Sterner und Liebl, 2001). Eine dieser Strategien ist dabei die Oligomerisierung von Proteinen in Komplexen, die die einzelnen Proteine vor dem Einfluss hoher Temperatur schützen. Die Iho670-Proteine, welche in der Fiber angeordnet sind, zeigen ein solches Verhalten, was bereits dadurch impliziert wird, dass selbst nach einem Hitzeschritt von 120 °C noch Fibers zu detektieren sind, die sich morphologisch nur unwesentlich von den nicht-hitzebehandelten Fibers unterscheiden. Die Iho670 Monomere, die auf der Oberfläche der kohlebeschichteten Goldgrids vorliegen und eventuell Reste ehemals adhätierender Fibers darstellen, besitzen diesen Schutz nicht. Durch den Hitzeschritt werden diese vormals als Hintergrundverschmutzung angesehenen Proteine komplett denaturiert, können nicht mehr an der Oberfläche adhätieren und werden somit im Zuge der unter Kap. II.13.4 beschriebenen Inkubationsschritte weggewaschen.

Das oben beschriebene Bindungsverhalten des rabbit anti-Iho670 Antikörpers erklärt auch die Ergebnisse der Ablöseversuche (vgl. Kap. III.2.4). In diesen Versuchen sollte eine mögliche Adhäsionsfunktion der Fibers nachgewiesen werden. Grundlage waren Untersuchungen von Näther *et al.* (2006), die ein Ablösen von *Pyrococcus furiosus*-Zellen beobachteten, nachdem spezifische Antikörper gegen diese Flagellen zu bewachsenen, kohlebeschichteten Goldgrids gegeben wurden. Durch Antigen-Antikörper-Reaktionen zwischen den spezifischen Flagellen-Antikörpern und den Epitopen der *Pyrococcus*-Flagellen kam es zu einer Ablösung der Zellen, wodurch nachgewiesen werden konnte, dass die Flagellen dieses Organismus nicht nur für dessen Motilität gebraucht werden, sondern auch eine Adhäsionsfunktion ausüben können. Im Falle der Fibers von *I. hospitalis* konnte allerdings kein derartiges Verhalten nachgewiesen werden. Elektronenmikroskopische Analysen von bewachsenen und mit rabbit anti-Iho670 Antikörpern inkubierten Goldgrids zeigten eindeutig Fibers in hoher Anzahl an. Dennoch kann eine Adhäsionsfunktion der Fibers auf Grundlage dieser Experimente nicht ausgeschlossen werden. Wie die zuvor beschriebenen Ergebnisse zeigen, handelt es sich bei den Epitopen, die der Iho670-Antikörper erkennt, primär um Epitope, die nicht auf der Oberfläche der Fibers exponiert vorliegen. Somit ist auch keine antikörperinduzierte Ablösung von Fibers und Zellen zu erwarten. Um definitive Aussagen in Bezug auf eine mögliche Adhäsionsfunktion treffen zu

können, könnten Ablöseversuche mit einem monoklonalen Antikörper durchgeführt werden, welcher genau gegen die Epitope gerichtet ist, die für die Adhäsion verantwortlich sind. Allerdings ist auch die Möglichkeit zu bedenken, dass die durch die Fibers vermittelten Adhäsionskräfte zu stark sind, um sie mit Hilfe von Antikörpern aufzulösen. Auch sterische Hinderungen des Antikörpers könnten eine Rolle für das schlechte Ablöseverhalten spielen. So besteht durchaus die Möglichkeit, dass der Antikörper durch seine Größe (ca. 10 nm) nicht in der Lage ist in den Zwischenraum zwischen der nativen Fiber und der Oberfläche zu diffundieren, was eine Ablösung unmöglich machen würde.

1.3 Immunmarkierung an Ultradünnschnitten

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von Immunmarkierungsexperimenten die intrazelluläre Verteilung des Iho670-Proteins zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Markierungsexperimente an in Cellulosekapillaren gewachsenen, hochdruckgefrorenen und gefriersubstituierten *I. hospitalis*-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten eindeutige Signale in der cytoplasmatischen und der äußeren Membran, als auch in den periplasmatischen Vesikeln der *I. hospitalis*-Zellen an. Zudem waren, wie zu erwarten, Fibers, die über bestimmte Bereiche längs geschnitten werden konnten, markiert. Wie zusätzlich in späteren Diskussionsteilen erörtert, zeigt das Iho670-Protein Homologien zu bakteriellen Typ IV Pilinen. Dies zeigt sich einerseits in der stark hydrophoben, N-terminal gelegenen Transmembranhelix, die durch Wechselwirkungen mit anderen dieser Helices eine zentrale Struktur innerhalb der Fibers ausbilden, welche wiederum als eine Art ‚Fiberrückgrat‘ angesehen werden kann (siehe Kap. IV.2.1). Andererseits lässt die Präsenz einer funktionstüchtigen Signalpeptidase (Igni_1405) sowie eines kurzen Signalpeptids auf ähnliche Mechanismen schließen, wie sie auch bei der Synthese von Typ IV Pili beobachtet werden konnten. Diese Beobachtungen machen die Vielzahl von Signalen innerhalb der cytoplasmatischen Membran verständlich, da aktuell davon ausgegangen wird, dass Typ IV Pili aus einem Pool von Pilinen, welcher sich in der cytoplasmatischen Membran befindet, gebildet werden. Diese Piline sind laut Parge *et al.* (1995) über ihren N-terminalen Bereich in der Cytoplasmamembran verankert. Im Verlauf der Pili-Assemblierung kommt es dabei zu einer Verschiebung der Piline, welche aus der Membran auswandern und in das Pilus-Filament eingebaut werden. Der Einbau erfolgt dabei über starke Wechselwirkungen der hydrophoben, N-terminalen Bereiche der Pilin-Untereinheiten, welche den zentralen Part der Typ IV Pili bilden (Merz und Forest, 2002). Andere Autoren wie Morand *et al.* (2004) gehen weiterhin davon aus, dass es im Verlauf der Retraktion der Typ IV Pili, welche bei einer Flagellen-unabhängigen Fortbewegung wie dem sozialen Gleiten in *Myxococcus xanthus* oder der sogenannten *twitching motility* in *Pseudomonas aeruginosa* oder *Neisseria*

gonorrhoeae eine wichtige Rolle spielt (Wu und Kaiser, 1995; Henrichsen, 1975; Sun *et al.*, 2000), zu einer Translokation von Pilinen in die cytoplasmatische Membran kommt. In dem sogenannten ‚Schmelz-Model‘ der Typ IV Pili Retraktion von Merz und Forest (2002) wurde postuliert, dass die Piline beim Abbau der Typ IV Pili in die cytoplasmatische Membran transferiert werden und es innerhalb dieses Bilayers zu einer Verdünnung der Pilin-Untereinheiten kommt. Was im weiteren Verlauf mit den Pilin-Untereinheiten geschieht, ist momentan unklar. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass es zu einem gänzlichen Abbau der Piline kommt, gehen einige Autoren davon aus, dass diese Piline zumindest teilweise für einen Aufbau neuer Typ IV Pili verwendet und damit sozusagen *recycled* werden (Morand *et al.*, 2004; Skerker und Berg, 2001).

Neben Signalen in der cytoplasmatischen Membran konnten bei *I. hospitalis* Markierungen in der äußeren Membran als auch in den periplasmatischen Vesikeln verzeichnet werden. Dies lässt einen Transport der Iho670-Proteine vermuten, da bereits 2002 von Rachel *et al.* eine Transportfunktion der periplasmatischen Vesikel angenommen wurde. Dabei könnte es sich einerseits um einen Transport der Proteine von der Cytoplasmamembran zur äußeren Membran bzw. von der äußeren Membran in Richtung cytoplasmatische Membran handeln. Auf den ersten Blick betrachtet ist das Auftauchen der Iho670-Proteine in der äußeren Membran von *I. hospitalis* sicherlich erstaunlich; dennoch gibt es zahlreiche Beispiele von Typ IV Pili synthetisierenden Bakterien, bei welchen Pilinproteine in der äußeren Membran nachgewiesen werden konnten. So vermuteten bereits Watts *et al.* (1982) neben einem cytoplasmatischen Pool von Pilinen einen weiteren Pilinpool in der äußeren Membran von *P. aeruginosa*. Auch bei *N. gonorrhoeae* wird vermutet, dass Piline in der Zellhülle dieser humanpathogenen Organismen vorkommen (Rudel *et al.*, 1995), welche eine Rolle bei Transformationsgeschehnissen spielen sollen. Eine Rolle der Typ IV Pili in Bezug auf Transformation bzw. der Aufnahme von DNA wurde auch von anderen Autoren beschrieben und gilt neben Biofilmbildung, Motilität oder Kolonisierung als weitere Funktion dieser dünnen, filamentösen Proteinstrukturen (van Schaik *et al.*, 2005; Shi und Sun, 2002; Klausen *et al.*, 2003; Merz *et al.*, 1999). In Bezug auf *N. gonorrhoeae* konnten Rudel *et al.* (2005) zeigen, dass die Proteine PilE (das Hauptpilusprotein) und PilC (ein Protein welches im Hinblick auf Aufbau und Adhäsion von Typ IV Pili bei Gonokokken eine Rolle spielt) essentiell für die Transformationskompetenz dieser Bakterien sind. Versuche mit PilC und PilE Mutanten sowie elektronenmikroskopische Untersuchungen von immunmarkierten Bakterien wiesen das Vorhandensein beider Proteine in der äußeren Membran nach, eine genaue funktionelle Analyse dieser Proteine sowie ihre Rolle in der äußeren Membran ist allerdings unklar. Auch Morand *et al.* (2004) konnten in Immunmarkierungsexperimenten an adhätierenden Meningokokken Pilinproteine sowohl in der inneren als auch in der äußeren Membran dieser Organismen feststellen. Zugleich zeigten sie, dass es im Verlauf der

Adhäsion zu einer Ungleichverteilung der Pilinproteine in den Membranen kommt. Konnten in einer frühen Phase der Adhäsion noch ca. 50 % der Pilinproteine in der äußeren Membran von *N. meningitidis* detektiert werden, verschob sich dieses Gleichgewicht nach acht Stunden Adhäsion stark zugunsten der cytoplasmatischen Membran. Auch bei Vergleich mehrerer immunmarkierter *I. hospitalis*-Zellen konnte eine Ungleichverteilung der Markierung zwischen der äußeren und der cytoplasmatischen Membran festgestellt werden, was einen Zusammenhang mit Adhäsionsgeschehnissen nahelegt. Da es sich bei den Fibers von *I. hospitalis* um Proteinaggregate handelt, welche in einer enormen Quantität produziert werden (vgl. Aufwuchsversuche auf kohlebeschichteten Goldgrids Abb. III.13 A), ist davon auszugehen, dass stets ein hoher Bedarf an Iho670-Proteinen besteht. Somit könnten die Iho670-Proteine in beiden Membranen als eine Art Speicherpool angesehen werden, die es *I. hospitalis* ermöglicht, innerhalb von kurzer Zeit neue Fibers zu produzieren. Dies erscheint vor allem im Hinblick auf das natürliche Habitat, aus welchem dieser Organismus isoliert werden konnte, sinnvoll. Dabei handelte es sich um heiße Proben (Temperatur ca. 90 °C) von Gestein und Kies, welche im Verlauf einer Tauchexkursion am Hydrothermalsystem des Kolbeinsey Rückens, nördlich von Island, in einer Tiefe von ca. 106 m gesammelt wurden (Fricke *et al.*, 1989; Paper *et al.*, 2007). Charakteristisch für dieses Habitat ist dabei einerseits die starke geothermale Erhitzung des mineralienreichen ausströmenden Wassers, welches sich mit dem kalten Meerwasser mischt, andererseits der teils gewaltige Wasserausstoß, der an diesen Öffnungen der Erdkruste zu verzeichnen ist. Da *I. hospitalis* für sein Wachstum Temperaturen von 73-98 °C benötigt, ist dieser Organismus darauf angewiesen, in eben diesem Temperaturgradienten zu verbleiben, was in einer Umgebung mit hohen Raten an ausströmendem Wasser schwierig ist. Zu diesem Zweck muss *I. hospitalis* Systeme entwickelt haben, die es ihm gestatten, möglichst effizient in dem von ihm benötigten Temperaturgradienten zu verbleiben. Eine dieser Anpassungen dürften dabei die Fibers darstellen, welche als Adhäsionsorganell wirken könnten und es den *Ignicoccus*-Zellen ermöglichen, trotz starker Strömungsraten in ihrem bevorzugten Gebiet zu verbleiben. Dadurch, dass *I. hospitalis* bereits Iho670-Proteine in seinen Membranen gespeichert hat, ist er in der Lage, sehr schnell auf veränderte Umweltbedingungen, wie beispielsweise eine Änderung der Ausflussrate des ausströmenden Wasser, zu reagieren und zusätzliche Fibers zu bilden. Des Weiteren wird eine schnelle Repolymerisation ermöglicht, falls die Fibers durch Umweltbedingungen beschädigt oder abgesichert werden.

Studien von Bally *et al.* (1992) liefern eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das Auftauchen von Iho670-Proteinen in der äußeren Membran von *I. hospitalis*. Durch Untersuchung der *xcp*-Gene, welche in *P. aeruginosa* für die Sekretion von vielen extrazellulären Proteinen verantwortlich sind, konnten die Autoren das *xcpA*-Gen als identisch zu *pilD* identifizieren, einem Gen, das für eine pilinprozessierende Peptidase codiert. Dieses bifunktionale Enzym

katalysiert die posttranslationale Modifikationen mehrerer Proteine, welche einerseits für die Assemblierung von Pilin-Untereinheiten in das Filament, andererseits für die Funktion des extrazellulären Protein-Sekretionsapparates zuständig sind (Strom *et al.*, 1991). Laut Bally *et al.* spielt XcpA eine entscheidende Rolle bei der Prozessierung von verschiedenen Xcp-Proteinen, welche Sequenzähnlichkeiten mit den N-terminalen Abschnitten von verschiedenen Typ IV Pilinen aufweisen. Klonierungsexperimente zeigten, dass XcpU nach einer Prozessierung durch die Peptidase eine Relokalisation innerhalb der Zellhülle erfährt; so wurde unprozessiertes XcpU ausschließlich in der Cytoplasmamembran detektiert, prozessiertes XcpU hingegen sowohl in der cytoplasmatischen als auch in der äußeren Membran von *P. aeruginosa*. Auch *I. hospitalis* weist mit Igni_1405 eine derartige Peptidase auf, womit auch hier eine durch die Peptidase induzierte Relokalisation der prozessierten Iho670-Proteine denkbar wäre. Da allerdings spätere Untersuchungen (Nunn und Lory, 1993; Pugsley und Possot, 1993) keine Umverteilung der durch PilD bzw. XcpA prozessierten, Pilin-ähnlichen Proteine feststellen konnten, bleibt diese Möglichkeit offen.

Denkbar wäre auch, dass die Iho670-Proteine in der äußeren Membran als Adhäsine wirken, welche es *I. hospitalis* ermöglichen, auf Oberflächen anzuheften. Beispiele für Adhäsine, welche in der Zellhülle von Mikroorganismen lokalisiert sind und Adhäsion vermitteln, sind zahlreich. So konnte beispielsweise in der äußeren Membran von *Fusobacterium nucleatum*, einem Pathogen des Mundraumes, RadD als Adhäsion identifiziert werden (Kaplan *et al.*, 2009). Zhang *et al.* (2004) beschrieben nach Studien an *Bartonella quintana* zwei Proteine der Vomp-Proteinfamilie, VompA und VompC, welche ebenfalls Adhäsionsfunktion aufwiesen. Diese Vomp-Proteine ähneln dabei den Adhäsinen YadA, einem Virulenzfaktor von *Yersinia enterocolitica*, UspA aus *Moraxella catarrhalis* und NadA von *N. meningitidis* (Paerregaard *et al.*, 1991; Hoiczky *et al.*, 2000; Comanducci *et al.*, 2002). Innerhalb des VompA Proteins konnte man zwei sich wiederholende, tandemförmig angeordnete Bereiche detektieren, von welchen vermutet wird, dass sie eine Rolle bei einer vermeintlichen Oligomerisierung der Vomp-Monomere spielen. Eine derartige Oligomerisierung konnte für das YadA-Protein bereits nachgewiesen werden und tritt bei *Yersinia* in Form von ‚Lollipop‘-Strukturen auf deren Oberfläche auf (Hoiczky *et al.*, 2000). Als letztes Beispiel in der beliebig weiterzuführenden Liste von adhäsiven Zellhüllproteinen soll das CBP-12 Protein aus *Fibrobacter succinogenes* dienen (Jun *et al.*, 2007). Dieses Protein wurde als Zellulosebindeprotein der äußeren Membran von *F. succinogenes* entdeckt. Bei genauerer Analyse konnten die Autoren dieses Protein als Typ IV Pilin-Protein identifizieren, welches im N-terminalen Bereich ca. 24 hoch konservierte, hydrophobe Aminosäuren aufweist, dessen restliche Proteinsequenz jedoch keinerlei Homologie mit bekannten Pilinproteinen anderer Bakterien aufwies. Ähnliche Verhältnisse können auch für den N-terminalen bzw. restlichen Abschnitt des Iho670-Proteins aus *I. hospitalis* beobachtet werden. Aus diesem Grund

erscheint eine Adhäsionsfunktion der Iho670-Proteine in der äußeren Membran von *I. hospitalis* durchaus möglich. Da auch die Fibers mit hoher Wahrscheinlichkeit Adhäsion vermitteln, könnten die Iho670-Proteine in der äußeren Membran eine primäre Anheftung bewirken, welche durch die im Anschluss stattfindende Fiberbildung bzw. Fiberadhäsion intensiviert und verstärkt wird. Auch im Hinblick auf das bereits zuvor beschriebene Habitat von *I. hospitalis*, welches durch Teils hohe Strömungsraten gekennzeichnet ist, erscheint ein solches Verhalten als durchaus sinnvoll. Dass in den unter Kap. III.2.4 beschriebenen Ablöseversuchen keine antikörperinduzierte Ablösung der Zellen beobachtet wurde, lässt keine definitive Aussage bezüglich dieser Fragestellung zu. Dennoch wird eine Erklärung durch die bereits unter Kap. IV.1.2 beschriebenen Eigenschaften des rabbit anti-Iho670 Antikörpers möglich. Da es sich um polyklonale Antikörper handelt, welche primär an nicht auf der Fibernoberfläche exponierte Epitope binden, ist es möglich, dass eine Vielzahl der Antikörper nicht an die nativ gefalteten Iho670-Proteine in der äußeren Membran binden kann. Bereits in Immunmarkierungsexperimenten mit Fibers in Lösung wurde eine Bindung der Antikörper primär an den Enden bzw. Anfangspunkten der Fibers beobachtet. Somit ist es verständlich, dass in den Ablöseversuchen keine Ablösung von ganzen Fibers detektiert werden konnte. Innerhalb der äußeren Membran ist ein ähnlich schlechtes Bindungsverhalten des rabbit anti-Iho670 Antikörpers denkbar, zumal unbekannt ist, ob und welche Proteinbereiche an der Oberfläche der Zelle präsentiert werden. Andererseits könnte eine Ablösung der Zellen auch durch die Fibers selbst verhindert werden. Geht man davon aus, dass der Iho670-Antikörper an die Fiberproteine der äußeren Membran bindet und die Adhäsion der äußeren Membran an Oberflächen auflöst, könnten die durch die Fibers vermittelten Adhäsionskräfte, welche nicht durch den Antikörper aufgelöst werden, immer noch ausreichen, um eine Adhäsion der Zellen an bestimmte Oberflächen zu gewährleisten. Definitive Aussagen zu dieser Fragestellung könnten hochauflösende Cryo-TEM Analysen liefern, welche dazu dienen könnten, die an der Fibernoberfläche bzw. an der äußeren Membran exponierten Aminosäuren zu identifizieren. Ein Knockout des Fibergens *igni_0670* bzw. eine gezielte genetische Manipulation des über Cryo-TEM identifizierten Bereiches sollte demnach zu einem Verlust der Adhäsion führen und die Frage nach der Funktion der Fibers eindeutig beantworten. Da allerdings seither noch keine Möglichkeit gefunden wurde, Zellen von *I. hospitalis* genetisch zu verändern, muss dieser Ansatz weiter offen bleiben.

1.4 Kreuzreaktionen mit *I. pacificus*, *I. islandicus* sowie der Co-Kultur Kin4/M

Im Zuge von Kreuzreaktionsversuchen mit dem rabbit anti-Iho670 Antikörper wurde die Bindungsaffinität dieses Antikörpers zu den beiden anderen beschriebenen *Ignicoccus*-

Arten, *I. pacificus* und *I. islandicus*, sowie zu der Co-Kultur, bestehend aus *I. hospitalis* und *N. equitans*, an elektronenmikroskopischen Präparaten getestet. Dabei konnte keine signifikante Kreuzreaktion an *I. pacificus* und *I. islandicus* festgestellt werden. Bei Versuchen mit der Co-Kultur Kin4/M konnte für *I. hospitalis* das gleiche Bindungsverhalten wie bei Verwendung der Reinkultur Kin4/I, welche nur aus *I. hospitalis* besteht, beobachtet werden. *N. equitans*-Zellen selbst zeigten keine Reaktivität mit dem Iho670 Antikörper, ließen jedoch Markierungen an deren Zellanhängen in Immunmarkierungsversuchen auf bewachsenen, kohlebeschichteten Goldgrids erkennen.

Die Beobachtung einer negativen Kreuzreaktion des Iho670 Antikörpers mit *I. pacificus* und *I. islandicus* ist schwierig zu erklären, konnten doch in vielen Fällen Kreuzreaktionen eines Flagellenantikörpers zwischen nah verwandten archaeellen Organismen wie beispielsweise innerhalb der Methanogenen beobachtet werden (Kalmokoff *et al.*, 1992). Auch innerhalb der bakteriellen Typ IV Pili, welche mit den archaeellen Flagellen und den Fibers zahlreiche Gemeinsamkeiten aufweisen, konnten antikörpervermittelte Kreuzreaktionen zwischen Typ IV Pilinen aus verschiedenen Organismen verzeichnet werden (Patel *et al.*, 1991). Dabei ist erwähnenswert, dass all diese Studien ausschließlich an Western Blot Experimenten mit anschließender Antikörperdetektion durchgeführt wurden; elektronenmikroskopische Studien wurden in keinem der hier angeführten Fälle beschrieben. Bereits in Meyer (2007) wurden Kreuzreaktionsexperimente des rabbit anti-LPC Antikörpers, welcher gegen das Hauptprotein der Zellanhänge von *I. pacificus* gerichtet ist, an Western Blots durchgeführt, wobei lediglich eine extrem schwache Kreuzreaktion festgestellt werden konnte. Western Blot Experimente hinsichtlich einer Kreuzreaktion des rabbit anti-Iho670 Antikörpers wurden aufgrund des experimentellen Aufwandes innerhalb dieser Dissertation aus Zeitgründen nicht durchgeführt, da eine solche Untersuchung eine Aufreinigung der Zellanhänge beider Organismen aus mindestens 100 L des Fermentationsüberstandes bedurft hätte. Dennoch lassen die erzielten Ergebnisse, gemeinsam mit den Ergebnissen der 3D-Rekonstruktionen des *I. pacificus* Filaments sowie der N-terminalen Sequenzierung des Hauptfilamentproteins von *I. pacificus*, mehrere Rückschlüsse zu. Die N-terminale Sequenzierung des Hauptfilamentproteins von *I. pacificus* stimmt in den ersten 16 Aminosäuren mit der N-terminalen Sequenz des Fiberproteins Iho670 überein, was darauf schließen lässt, dass es sich auch bei den Zellanhängen von *I. pacificus* um Strukturen handelt, die den bakteriellen Typ IV Pili ähnlich sind. Der hydrophobe N-Terminus bildet mit großer Sicherheit, analog zu den Fibers von *I. hospitalis*, ein Gerüst aus α -Helices im Inneren der Zellanhänge aus, welches als eine Art Rückgrat der Filamente anzusehen ist. Dennoch finden sich auch zahlreiche Unterschiede zwischen den Zellanhängen von *I. hospitalis* und *I. pacificus*, welche eine fehlende oder extrem schwache Kreuzreaktion der Antikörper mit den jeweiligen Strukturen erklären können. Einerseits zeigt das Filamentprotein von *I. pacificus* mit 39 kDa eine deutlich andere

relative apparente Molekularmasse als das Iho670-Protein, welches ca. 33 kDa aufweist. Andererseits konnten in einer 3D-Rekonstruktion mehrere strukturelle Unterschiede zwischen beiden Filamenten ermittelt werden, was für Unterschiede in der Verknüpfung der Untereinheiten untereinander spricht. Somit ist davon auszugehen, dass die Aminosäure-abfolge, mit Ausnahme des N-terminalen Bereiches, deutliche Unterschiede zwischen den beiden Filamentproteinen aufweist. Da weder das Genom von *I. pacificus* noch das von *I. islandicus* sequenziert ist, kann über diese Unterschiede keine genaue Aussage getroffen werden. Vor diesem Hintergrund wäre eine Sequenzierung beider Organismen sicherlich hilfreich.

Gómez-Duarte *et al.* (1999), welche sich mit Kreuzreaktionen zwischen Typ IV Pilin-Strukturen von enterotoxischen *E. coli*-Stämmen beschäftigten, konnten ähnliche Beobachtungen anstellen wie im Falle der Kreuzreaktionen der *Ignicoccus*-Arten mit dem Iho670 Antikörper. Die Autoren untersuchten dabei Kreuzreaktionen zwischen Antikörpern, welche einerseits gegen Epitope von CFA/III-Pili, andererseits gegen *Longus*-Epitope gerichtet waren. Sowohl die sogenannte *Longus*-Struktur als auch CFA/III-Pili stellen Typ IV Pilin-Strukturen dar, welche hohe Sequenzähnlichkeiten in ihrem N-terminalen Bereich aufweisen. Kreuzreaktionen an Western Blots zeigten hier nur eine schwache Kreuzreaktion des *Longus*-Antikörpers mit den CFA/III-Pilinen, der Antikörper gegen die CFA/III-Piline hingegen keinerlei Reaktion mit den *Longus*-Proteinen. Auch an elektronenmikroskopischen Präparaten konnte keinerlei Kreuzreaktion der jeweiligen Antikörper mit der *Longus*-Struktur bzw. den CFA/III-Pili festgestellt werden. Die Autoren fassten somit die These, dass an elektronenmikroskopischen Präparaten keine gemeinsamen Epitope an den beiden Strukturen detektierbar sind, die positive Kreuzreaktion an Western Blots allerdings dafür spricht, dass ähnliche Epitope nach vollständiger Denaturierung erkannt werden können.

Das Auftauchen von Markierungen an Zellanhängen von *N. equitans* wirft ebenfalls zahlreiche Fragen auf und lässt vermuten, dass Iho670-Proteine aus *I. hospitalis* in *N. equitans*-Zellen importiert werden könnten. Dies konnte bereits für einige Lipide und Aminosäuren von *N. equitans* festgestellt werden, wo ¹³C Markierungen eindeutig zeigten, dass diese in *I. hospitalis* produziert wurden (Jahn *et al.*, 2004; Jahn *et al.*, 2008). *N. equitans* ist bei seinem Wachstum auf die Anwesenheit von *I. hospitalis* angewiesen, welcher als Wirt von *N. equitans* angesehen wird (Jahn *et al.*, 2008). Mit nur 0,49 Mbp weist *N. equitans* das bisher kleinste bekannte Genom eines archaeeellen Organismus auf, zudem fehlen ihm bekannte Gene für die Biosynthese von Nukleotiden, vielen Aminosäuren, Co-faktoren und Lipiden (Waters *et al.*, 2003). Bereits in früheren experimentellen Ansätzen konnten Zellanhänge an einigen elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *N. equitans*-Zellen detektiert werden (Huber *et al.*, 2003), jedoch ergab eine Datenbanksuche keinen Hinweis auf die Existenz von Genen, welche in *N. equitans* für Piline, Fiberproteine oder

Flagelline codieren (Podar *et al.*, 2008). Genetische Analysen an *N. equitans* führten allerdings zu der Entdeckung von zwei Genen, *NEQ169* und *NEQ425*, welche dem Typ II/IV Proteinexport System angehören und bei der Biosynthese von Pili, Flagellen oder anderen Zellanhängen eine Rolle spielen könnten (Waters *et al.*, 2003). Ähnliches konnte für die Proteine *NEQ267* und *NEQ268* beobachtet werden, da auch hier Blast Search Analysen Ähnlichkeiten mit Proteinen des Typ II/IV Proteinexport Systems ergaben (Daten nicht gezeigt). Daneben zeigten diese Proteine Sequenzähnlichkeiten mit FlaJ, einem archaeellen, flagellenspezifischen Protein, welches die Membran durchspannt und eine Rolle bei der Assemblierung der archaeellen Flagellen spielt (Thomas *et al.*, 2002; Bardy *et al.*, 2004). FlaJ gilt dabei als eines der am stärksten konservierten Proteine auf Sequenzebene, was eine fundamentale Rolle beim Aufbau und/oder der Funktion der Zellanhänge impliziert (Desmond *et al.*, 2007). Somit erscheint es durchaus möglich, dass *N. equitans* neben Lipiden und anderen Faktoren auch Bestandteile der Zellanhänge von *I. hospitalis* importiert. Ähnlich wie für den Aufbau seiner ATPase vermutet (Küper, persönliche Mitteilung), könnten in *N. equitans* rudimentäre Anlagen existieren, welche erst in Kombination mit importierten Filamentbestandteilen die Zelle in die Lage versetzen, vollständige Zellanhänge auszubilden. Dabei könnte *N. equitans* die Zellanhänge beispielsweise für einen Wirtswechsel von einer *I. hospitalis*-Zelle zur anderen gebrauchen. Jahn *et al.* (2008) konnte bereits zeigen, dass freie *N. equitans*-Zellen durchaus in der Lage sind, die Trennung von ihrem Wirt für einen kurzen Zeitraum zu überleben. Dies wäre biologisch durchaus sinnvoll, geht man doch davon aus, dass *N. equitans* seinem Wirt *I. hospitalis* längstmöglich Zellbestandteile entzieht, ohne ihn jedoch sofort umzubringen (Jahn *et al.*, 2008), womit sich dieses Verhalten klar vom Verhalten typischer parasitärer Bakterien wie *Bdellovibrio* oder *Bacteriovorax*, welche zuerst ihren Wirt töten und sich dann von dessen Zellbestandteilen ernähren, unterscheidet (Baer *et al.*, 2004; Starr und Baigent, 1966). Dennoch ist davon auszugehen, dass ein Befall von *I. hospitalis* mit *N. equitans*-Zellen schädlich für die Wirtszelle ist (vgl. EM-Aufnahmen von Wasserburger, 2008 und Heimerl, 2009), so dass ein Wirtswechsel für *N. equitans* früher oder später zwingend notwendig wird.

2 Aufbau und Struktur der Fiberfilamente

2.1 3D-Rekonstruktion der Fiberfilamente mit Hilfe des IHRSR-Algorithmus

In Kooperation mit Prof. E. H. Egelman wurde eine dreidimensionale Rekonstruktion des Fiberfilaments von *I. hospitalis*, auf der Grundlage von negativkontrastierten Fibers aus

Aufwuchsversuchen sowie von cryo-elektronenmikroskopischen Daten, mit Hilfe des IHRSR-Algorithmus durchgeführt. Auf diese Weise konnte als primäres Aufbaumerkmal eine rechtsgängige, dreizählige Symmetrie ermittelt werden, welche durch eine starke Verknüpfung der Iho670-Monomere entlang dieser Helix vermittelt wird. Des Weiteren konnten schwächere Verknüpfungen der Untereinheiten entlang einer linksgängigen, siebenzähligen Helix sowie einer rechtsgewundenen, zehnzähligen Helix detektiert werden. Im zentralen Bereich des Filaments wurde eine Struktur erkannt, die durch α -helikale Ausläufer gebildet wird und in welche atomare Modelle der hydrophoben, N-terminalen Bereiche der Iho670-Proteine eingefügt werden konnten.

Die Ergebnisse dieser Rekonstruktion lassen Vergleiche mit bisher bekannten Rekonstruktionen von bakteriellen und archaeellen Zellanhängen zu und führen zu dem Schluss, dass es sich bei den Fibers von *I. hospitalis* um eine mit bakteriellen Typ IV Pili verwandte Struktur handelt. Eine Analogie zu bakteriellen Flagellenfilamenten wie dem von *Salmonella enterica* serovar Typhimurium kann aufgrund der Ergebnisse der dreidimensionalen Rekonstruktion des *I. hospitalis* Filaments klar ausgeschlossen werden. Dieser Schluss liegt im Aufbau des Filaments dieser bakteriellen Flagellen begründet. Bakterielle Flagellenfilamente können als röhrenförmige Strukturen beschrieben werden, die einen Aufbau aus meist elf sogenannten Protofilamenten zeigen und einen zentralen Tunnel von ca. 3 nm besitzen (Namba *et al.*, 1989). Diese Protofilamente sind selbst wiederum durch eine longitudinale, helikale Anordnung von Flagellinproteinen gekennzeichnet (O'Brian und Bennett, 1972). Cryo-Elektronenmikroskopische Untersuchungen sowie helikale Bildanalysen konnten die Struktur von zwei Typen von geraden Flagellen von *S. enterica* serovar Typhimurium-Mutanten enthüllen: einerseits die Struktur des R-Typ Filaments, bei welcher alle Protofilamente in einer rechtsgängigen Konformation vorliegen, andererseits die Struktur des sogenannten L-Typ Filaments, bei welcher alle Protofilamente eine linksgängige Konformation besitzen (Hyman und Trachtenberg, 1991; Kanto *et al.*, 1991; Yonekura *et al.*, 2003; Yonekura *et al.*, 2005; Yonekura *et al.*, 2010). Dabei zeigen die Bausteine der Protofilamente, die Flagelline, einen Aufbau aus vier Domänen D0-D3, wobei die inneren Domänen D0 und D1 den dicht gepackten Kern des Filaments aufbauen. Die Domänen D2 und D3 bilden hingegen eine Art Ausläufer der Oberfläche, welche sich ca. 12 nm weit erstrecken (siehe Abb. IV.1) und in keinerlei Verbindung zu den entsprechenden Flagellindomänen in benachbarten Protofilamenten

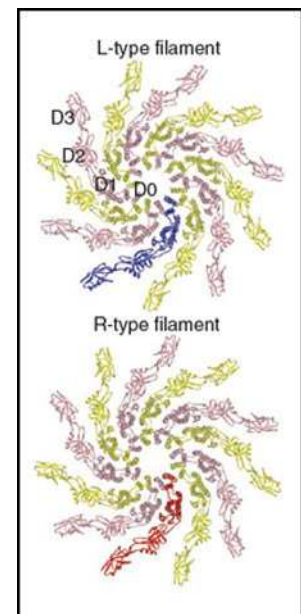


Abb. IV.1: L- und R-Typ des Filaments des bakteriellen Flagellums (Aufsicht) von *S. enterica* serovar Typhimurium mit zugeordneten Flagellin-Domänen D0-D3 (aus Yonekura *et al.*, 2010)

stehen. Cryo-Elektronenmikroskopische Studien zeigten, dass die innerste Domäne D0 aus ca. 30 N-terminalen und ca. 30 C-terminalen Aminosäuren aufgebaut ist, welche eine α -helikale *Coiled-coil* Struktur bilden (Mimori-Kiyosue *et al.*, 1997). Völlig andere Verhältnisse konnten in dem dreidimensional rekonstruierten Filament von *I. hospitalis* beschrieben werden. Zunächst weisen diese Filamente keinen zentralen Kanal oder Tunnel auf, wie er in Abb. IV.1 innerhalb des bakteriellen Filaments beobachtet werden konnte, sondern zeigen vielmehr eine zentrale Struktur im Inneren, welche durch α -helikale Ausläufer der N-terminalen Bereiche der Iho670-Proteine gebildet wird. Des Weiteren spricht eine starke Interaktion der globulären Domänen des *I. hospitalis* Filaments klar gegen eine Formation von Protofilamenten, da diese in ihren äußeren Bereichen (D2 und D3) keinerlei Kontakt zu entsprechenden Bereichen benachbarter Protofilamente ausbilden würden. Im Gegensatz dazu konnten zahlreiche Ähnlichkeiten mit dreidimensional rekonstruierten Filamenten bakterieller Typ IV Pili und archaeeller Flagellen beobachtet werden.

So zeigte eine dreidimensionale Rekonstruktion mit Hilfe des IHRSR Algorithmus eine zentrale Kernstruktur in der Mitte des Filaments der Flagellen von *Halobacterium salinarum* (Trachtenberg *et al.*, 2005). Die Autoren konnten zeigen, dass diese zentrale Struktur, analog zu der Kernstruktur der Iho670-Fibers, allein durch α -Helices gebildet wird, welche sich im N-terminalen Bereich der Flagellinmonomere befinden. Analoge Beobachtungen konnten auch am Filament der Flagellen von *Sulfolobus shibatae* gemacht werden (Cohen-Krausz und Trachtenberg, 2008). Auch an dreidimensional rekonstruierten Typ IV Pili wurden zentrale Bereiche identifiziert, welche durch erhebliche Interaktionen der hydrophoben N-terminalen α -Helices der Pilinproteine zustande kommen (Craig *et al.*, 2006). Ein derartiges Verhalten beider Strukturen wird durch die hohe Sequenzähnlichkeit zwischen den N-terminalen Bereichen der archaeellen Flagelline und der bakteriellen Typ IV Pili verständlich. In beiden Fällen handelt es sich um homologe Proteinbereiche, welche sich, wie der N-terminale Abschnitt des Fiberproteins Iho670, durch einen hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren in der N-terminalen Region auszeichnen (Bayley und Jarrell, 1998).

Auch in Bezug auf die grundsätzliche Symmetrie innerhalb des *I. hospitalis*-Filaments sowie der dort beobachteten Interaktionen zwischen den globulären Domänen gibt es Ähnlichkeiten zu archaeellen Flagellen. *H. salinarum* zeigt wie *I. hospitalis* Symmetrien, welche durch eine rechtsgewundene, dreizählige Helix; eine linksgängige, siebenzählige sowie eine rechtsgängige, zehnzählige Helix beschrieben werden können (Trachtenberg *et al.*, 2005). Zudem zeigen die globulären Domänen bei *H. salinarum* eine starke Konnektivität untereinander, welche allerdings nicht immer konstant war. So konnten Trachtenberg *et al.* (2005) unterschiedliche Typen von Filamenten beschreiben, welche sich im Hinblick auf ihre Form und die zugrundeliegende Konnektivität der Untereinheiten unterschieden. Dieses Phänomen steht dabei wohl im Zusammenhang mit verschiedenen intermediären Formen,

welche im Zuge des *switches* der Flagellinuntereinheiten auftreten können, was an späterer Stelle noch genauer diskutiert wird. Eine derartige Variabilität wurde allerdings nur im Hinblick auf die globulären Domänen beobachtet, der zentrale Kern wies in allen Filamenten stets eine konstante Struktur auf. Auch die Symmetrie des Filaments von *S. shibatae* ist durch eine grundsätzlich dreizählige, rechtsgewundene Helix gekennzeichnet, zudem konnten auch hier wieder starke Interaktionen innerhalb der globulären Domänen festgestellt werden. Leichte Unterschiede ergeben sich in Bezug auf bakterielle Typ IV Pili. Zwar kommt es auch bei den globulären Domänen des Pilus von *N. gonorrhoeae* zu Interaktionen zwischen den Pilinen, jedoch zeigt das Filament andere Symmetrieeigenschaften, welche durch eine rechtsgängige, einzählige Helix; eine rechtsgängige, vierzählige Helix sowie eine linksgewundene, dreizählige Helix beschrieben werden können (Craig *et al.*, 2006).

2.2 Variabilität der Fiberstruktur als Hinweis auf unterschiedliche Fiberkonformationen

Wie in Kap. III.3 beschrieben, zeigten die Fibers von *I. hospitalis* unterschiedliche Erscheinungsformen auf bewachsenen Goldgrids. So konnten einerseits lange, gerade Fiberabschnitte dokumentiert werden, welche an manchen Stellen kurzfristig in einen anderen Zustand übergingen. An solchen Stellen zeigten die Fibers ein ‚gewelltes‘ Erscheinungsbild, welches allerdings nach einer kurzen Strecke wieder von einer geraden Verlaufsform abgelöst wurde.

Ähnliche Beobachtungen konnten bei bakteriellen Flagellen gemacht werden, wo man zwischen linksgewundenen Flagellen, deren Konformation als *normal* bezeichnet wird, und drei unterschiedlichen Typen von rechtsgewundenen Flagellen unterscheiden kann: *semicoil*, *curly I* und *curly II* (Macnab und Ornston, 1977; Turner *et al.*, 2000). Dabei spielt die Windungsrichtung der Flagellen eine wichtige Rolle bei der Chemo- und Mototaxis, bei welchen das Schwimmverhalten der Bakterien durch abwechselnde Schwimm- und Tumbelbewegungen geprägt ist.

So konnten Studien an *S. enterica* und *E. coli* zeigen, dass der flagellare Motor durch Rotation im Uhrzeigersinn die Schwimmbewegung auslöst, bei welcher die Flagellen eine linkshändig helikale (L-) Konformation einnehmen (Macnab, 1977). Auf diese Weise bildet sich ein Flagellenbündel hinter der Zelle, welches die Bewegung vorantreibt. Der Motor ändert seine Rotationsrichtung in regelmäßigem Wechsel (Larsen *et al.*, 1974), wobei eine Änderung der linksgewundenen Flagellenform in eine rechtsgewundene (R-) Form erzwungen wird, durch welche das Bündel auseinanderfällt und die Zelle in eine ungerichtete Tumbelbewegung übergeht. Dieser Wechsel von einer links- zu einer rechtsgewundenen Flagellenform wird durch eine Änderung der Orientierung der Helices der Protofilamente

induziert, welche wiederum durch veränderte Abstände der Flagellinproteine zwischen den linksgedrehten (L-) und den rechtsgedrehten (R-) Protofilamenten ausgelöst wird. So konnte der Abstand von sich wiederholenden Untereinheiten in L-typischen Protofilamenten mit 52,7 Å, jener von R-typischen Protofilamenten mit 51,9 Å ermittelt werden (Yamashita *et al.*, 1998). Das bedeutet also, dass die Differenz von 0,8 Å verantwortlich für die verschiedenen Supercoil-Formen von bakteriellen Filamenten ist, was auch als *cooperative switching* oder Polymorphismus bezeichnet wird.

In einer Modellberechnung konnten Mischungen dieser Protofilamentkonformationen ermittelt werden, welche die verschiedenen Flagellenzustände beschreiben: 9 L-Protofilamente und 2 R-Protofilamente bezeichnen demnach den als *normal* beschriebenen, linksgewundenen Flagellenzustand, 8L/3R beschreiben die *coil*-Konformation, 7L/4R die rechtsgewundene *semicoil*-Konformation, 6L/5R die *curly I* und 5L/6R die *curly II*-Konformation (Yamashita *et al.*, 1998; Hasegawa *et al.*, 1998). In Folge dieser Mischung verschiedener Typen von Protofilamenten entsteht ein mechanischer Stress innerhalb des Filaments, der dadurch abgebaut wird, dass sich die Flagelle verbiegt, krümmt und somit letztendlich in eine bestimmte Supercoil-Form übergeht.

Archaeelle Flagellen haben, wie bereits zuvor diskutiert, eine komplett andere Symmetrie, eine sich unterscheidende Flagellinzusammensetzung sowie einen verschiedenartigen Assemblierungsmechanismus im Vergleich zu den bakteriellen Flagellen. Dennoch wird vermutet, dass hier eine ähnliche Art des Polymorphismus, welcher durch Änderungen der Abstände der Flagellinmonomere zueinander ausgelöst wird, vorliegt und somit in dieser Hinsicht eine konvergente Evolution zwischen bakteriellen und archaeellen Filamenten stattgefunden hat. So konnten Trachtenberg *et al.* (2005) zeigen, dass das Filament von *H. salinarum* in verschiedenen Konformationen vorliegen kann, welche durch unterschiedliche Konnektivitäten der Flagellinmonomere gekennzeichnet sind. Diese Variabilität könnte somit nach Meinung der Autoren intermediäre Formen des Flagellin-*switches* reflektieren, welche für eine kontrollierte Schwimmbewegung von *H. salinarum* von entscheidender Bedeutung sein könnten. Auch an dem Filament von *S. shibatae* B12 konnten zwei unterschiedliche Filamentkonformationen beobachtet werden, von denen eine eine helikale Symmetrie, ähnlich wie bei dem Filament von *H. salinarum* aufweist (Cohen-Krausz und Trachtenberg, 2008), die andere Flagellenkonformation durch helikal angeordnete, gestapelte Scheiben mit einer C₃-Symmetrie charakterisiert ist. Der Übergang von einer Konformation in die Andere wird dabei durch eine geringfügige Verdrehung der Untereinheiten zueinander ausgelöst. Dabei unterscheiden sich beide Konformationen hauptsächlich durch die Konnektivität der Monomere innerhalb der globulären Domänen, die zentrale Struktur, gebildet von den N-terminalen α-helikalen Bereichen der Flagellinproteine, bleibt relativ unverändert. Auch in diesem Beispiel wird ein Zusammenhang mit Polymorphismus und *switching*-Eigenschaften

von archaeellen Flagellen diskutiert, welche in Bezug auf Schwimmverhalten und Chemotaxis eine wichtige Rolle spielen könnten.

Da auch innerhalb des *I. hospitalis* Filaments verschiedene Konformationen beobachtet werden konnten, ist auch hier ein Zusammenhang mit verschiedenen Supercoil-Formen der Fibers denkbar. Da die Fibers von *I. hospitalis* strukturell betrachtet zahlreiche Ähnlichkeiten mit archaeellen Flagellen aufweisen, könnte auch hier eine Änderung in der Konnektivität der Untereinheiten das ‚gewellte‘ Erscheinungsbild der Fibers auslösen. In den Fällen, in denen das Filament ein anderes Filament kreuzt, kommt es wohl durch mechanische Reize zu einer veränderten Konnektivität der Untereinheiten in den globulären Bereichen, womit an dieser Stelle eine Art Spannung oder Stress entsteht, welche durch eine Biegung des Filaments in diesem Bereich abgebaut wird. Diese Beobachtungen zeigen, dass die *I. hospitalis*-Fibers in der Lage zu sein scheinen verschiedenen Konformationen einzunehmen. Fraglich bleibt die biologische Relevanz dieses Phänomens, das nicht nur an Stellen beobachtet werden konnte, an denen sich Fibers kreuzten, sondern auch an Stellen, an denen keinerlei mechanischer Reiz für die Fiberkrümmungen vorlag.

Da an *I. hospitalis*-Zellen anhand von thermo-mikroskopischen Versuchen keine Motilität festgestellt werden konnte (Prof. Wirth, persönliche Mitteilung), scheint ein Zusammenhang mit einer Regulation der Schwimmbewegung unwahrscheinlich. Allerdings kann diese Erklärung nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da das Nicht-Beobachten eines Schwimmverhaltens auch an zahlreichen, bisher nicht optimierten, experimentellen Parametern liegen könnte. Denkbar wäre beispielsweise ein Zusammenhang mit der Adhäsion, welche wahrscheinlich durch die Fibers bewirkt wird. So könnte eine veränderte Konformation der Fibers in den ‚gewellten‘ Bereichen dazu führen, dass die Epitope, welche die Adhäsion bewirken, durch die veränderten Bindungseigenschaften der Untereinheiten der globulären Domänen verdeckt werden. Somit würde die Adhäsionskraft der Fibers abnehmen und die Zelle könnte sich wieder von ihrem Untergrund lösen.

2.3 Polymerisationsversuche

Dreidimensionale Rekonstruktionen zeigten für das Filament von *I. hospitalis* die Existenz einer zentralen Struktur, welche durch α -helikale Bereiche des Iho670-Proteins gebildet wird. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Struktur durch die hydrophoben N-terminalen Bereiche der Fiberproteine gebildet wird, was eine Ähnlichkeit mit bakteriellen Typ IV Pili und archaeellen Flagellen impliziert. Da diese N-terminalen Bereiche von vielen Autoren als essentiell für eine Polymerisation der Monomere zu filamentösen Strukturen angesehen werden (Jarrell *et al.*, 1996; Hansen und Forest, 2006), wurden Polymerisationsversuche mit rekombinanten Fiberproteinen durchgeführt, um diese Frage zu klären. Zu diesem Zweck

wurden rekombinante Fiberproteine synthetisiert, welchen der hydrophobe N-terminale Bereich fehlte. Zu Vergleichszwecken wurden analoge Experimente mit rekombinanten Fiberproteinen durchgeführt, deren N-Terminus vorhanden war. In beiden Ansätzen konnten Polymerisationsgeschehen sowohl über Western Blots als auch durch elektronenmikroskopische Untersuchungen nachgewiesen werden.

Eine Polymerisation von Proteinen, welche am Aufbau diverser filamentöser Strukturen beteiligt sind, konnte bereits für mehrere Proteine nachgewiesen werden und ist auch für das Iho670-Protein denkbar. So wurden bereits für das Hüllprotein des archaellen Virus ARV1 (Häring, 2005), das Fimbrienprotein Mth60, welches maßgeblich am Aufbau der Fimbrien von *Methanothermobacter thermoautotrophicus* beteiligt ist (Thoma *et al.*, 2008; Frank, 2006), das RecA Protein, welches eine Rolle bei der Reparatur und Aufrechterhaltung von DNA spielt (Yu *et al.*, 1995) oder das Protein τ (Tau), welches mit Mikrotubuli assoziiert vorliegt und deren Zusammenbau reguliert (de Garcini *et al.*, 1986; Alonso *et al.*, 2001), Polymerisationen von Proteinmonomeren zu filamentösen Strukturen beschrieben. Eines der prominentesten Beispiele im Hinblick auf eine Polymerisation von Zellanhangsproteinen dürfte dabei die bakterielle Flagelle darstellen, bei welcher eine Polymerisation von Flagellinmonomeren durch eine Zugabe von fragmentierten Flagellen als Polymerisationskeim ausgelöst werden kann (Asakura *et al.*, 1964; Ikeda *et al.*, 1984; Auvary *et al.*, 2001).

Auch innerhalb der Typ IV Pili können Polymerisationsgeschehen beobachtet werden. So stammen viele der Typ IV Pilin-Strukturen, welche über X-ray Kristallographie oder NMR-Spektroskopie ermittelt wurden, aus rekombinanten Pilinen. Allerdings fehlte diesen rekombinanten Proteinen in den meisten Fällen die N-terminale Domäne, da diese aufgrund der stattfindenden Polymerisation von Pilinmonomeren zu filamentösen Pilinstrukturen eine Analyse unmöglich machte (Audette *et al.*, 2004a; Craig *et al.*, 2003; Hazes *et al.*, 2000; Keizer *et al.*, 2001; Ramboarina *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2004). Somit ist das Auftauchen von oligomeren Formen der Iho670-Konstrukte Igni_0670_{rek1} und Igni_0670_{rek2}, welche die N-terminale Domäne aufweisen, innerhalb von Western Blot-Analysen nicht verwunderlich, gilt doch dieser Teil des Proteins als essentiell für Polymerisationsgeschehen. Unerwartet war das Ergebnis, das mit den N-terminal verkürzten Iho670-Konstrukten, Igni_0670kurz_{rek1} und Igni_0670kurz_{rek2}, erzielt werden konnte. Auch hier zeigten beide Ansätze das Auftauchen von oligomeren Formen der Iho670-Konstrukte in Western Blot Analysen. Bereits Audette *et al.* (2004b) konnte Polymerisation an N-terminal verkürzten Typ IV Pilin Proteinen von *P. aeruginosa* feststellen, bei welchen sich sogenannte *Nanotubes* bildeten. Diese *Nanotubes* besaßen in ihrer Mitte einen ca. 2 nm breiten Kanal, welcher anstatt der zentralen Struktur, die normalerweise aus den α -helikalen Bereichen der unverkürzten Pilinproteine gebildet wird, auftauchte. Damit ergeben sich auch für die Fibers von *I. hospitalis* interessante Ansätze für eine Nutzung als *Nanotubes*. Laut Audette *et al.* (2004b) wird die Polymerisation

der N-terminal verkürzten Piline durch eine hydrophobizitäts-initiierte Konformationsänderung der Pilinmonomere verursacht, wobei das hydrophobe Säulenmaterial (in diesem Fall Superdex-Resin), welches bei der Aufreinigung eingesetzt wurde, primär als Keim für die Polymerisation wirkt. Ähnliche Verhältnisse könnten auch im Fall von Igni_0670kurz_{rek1} bzw. rek2 vorliegen, da auch hier eine Aufreinigung über hydrophobes Säulenmaterial (TED) erfolgte. Eine andere Erklärung liefern die Ergebnisse der dreidimensionalen Rekonstruktion (s. Kap. III.9), die eine starke Interaktion unter den globulären Domänen der Fiberproteine zeigten. Somit wäre es durchaus denkbar, dass diese Interaktionen der Iho670-Untereinheiten eine wesentliche Rolle bei der Polymerisation der N-terminal verkürzten Iho670-Konstrukte spielen könnten. Auf alle Fälle zeigen diese Ergebnisse, dass die N-terminale Domäne, zumindest bei den Fibers, nicht allein für eine Polymerisation verantwortlich zu sein scheint. Bei den Konstrukten Igni_0670_{rek1} und Igni_0670kurz_{rek1} konnte die monomere Form bei ca. 35 bzw. 33 kDa als die dominierende Proteinform detektiert werden; dimere, trimere und tetramere Zustände des Proteins waren in weit geringerem Anteil zu verzeichnen. Dies liegt wahrscheinlich am verwendeten Detektionssystem, für welches die SDS-PAGE gewählt wurde. Zwar wurde auf hohe SDS-Anteile im Probenpuffer und eine Hitzedenaturierung vor dem Auftrag in die Geltaschen verzichtet, dennoch ist zu erwarten, dass das Verhältnis von Monomer zu oligomeren Formen bei Verwendung der nativen SDS-PAGE zugunsten der oligomeren Formen verschoben wird (Schägger und von Jagow, 1991; Schägger *et al.*, 1994). Aus Zeitgründen wurde eine solche Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt, dennoch sollte eine derartige Analyse für nachfolgende Versuche berücksichtigt werden. Im direkten Vergleich von Igni_0670_{rek1} bzw. Igni_0670kurz_{rek1} mit den Konstrukten Igni_0670_{rek2} und Igni_0670kurz_{rek2} zeigte sich eine scheinbar effektivere Polymerisation bei Verwendung der Konstrukte, bei welchen der C-terminale His-Tag mit Thrombin entfernt wurde. Bereits nach kurzer Zeit konnte in diesen Ansätzen kein Fiberprotein mehr in monomerer Form detektiert werden. Da bei dem Igni_0670_{rek2} Konstrukt keine definierten Banden, sondern lediglich ein hochmolekular Schmier zu detektieren war, sind Aussagen über die Polymerisationseffizienz dieses Konstruktes schwierig. Polymerisationsansätze mit höherer Proteinkonzentration und kürzeren Polymerisationszeiten könnten dieses Problem lösen und eventuell zur Detektion von definierten Banden führen, die eine Analyse über Edman-Abbau ermöglichen könnten. Das Konstrukt Igni_0670kurz_{rek2} zeigte hingegen eine sehr gute Polymerisationseffizienz, bereits kurz nach der Aufreinigung konnten oligomere Formen des Proteins detektiert und über Sequenzierung zweifelsfrei identifiziert werden. Im Vergleich mit dem Konstrukt Igni_0670kurz_{rek1} ist diese bessere Polymerisationseffizienz verständlich, da dieses Konstrukt durch den fehlenden C-terminalen His-Tag näher am nativen Vorbild liegt. Grundsätzlich sind jedoch bei allen Versuchen weitere Analysen von Nöten. Dabei sollten vor allem weitere Versuche zur Polymerisation

unter definierten Bedingungen durchgeführt werden, wobei stets gleiche Proteinmengen in alle Versuche eingesetzt werden müssen. Nur auf diese Weise kann eine Polymerisations-effizienz fehlerfrei untersucht werden.

Wie bereits erwähnt wurden die Konstrukte der Polymerisationsansätze nicht über native SDS-PAGE auf das Vorhandensein von Iho670-Oligomere untersucht. Stattdessen wurden elektronenmikroskopische Präparate angefertigt, welche auf ein Vorkommen von filamentösen Proteinaggregaten hin untersucht wurden. Derartige Strukturen konnten in allen Ansätzen bei Temperaturen von 4-37°C erkannt werden. Ob es sich bei den beobachteten Strukturen allerdings wirklich um Aggregate der Iho670-Konstrukte handelt, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, da auch andere in den Ansätzen vorhandene Proteine am Aufbau der filamentösen Strukturen beteiligt sein könnten. Zwar zeigten SDS-PAGEs der eingesetzten Proteinchargen eine Existenz von weiteren, nicht näher charakterisierten Proteinen an, jedoch lagen diese Proteine im Vergleich zu den Iho670-Proteinkonstrukten in einer sehr geringen Konzentration vor. Dennoch kann eine Beteiligung dieser Proteine beim Aufbau der Filamente nicht gänzlich ausgeschlossen werden. In Negativkontrollen, in welchen die Proteinlösung durch Puffer ersetzt wurde, konnten keine derartigen filamentösen Strukturen erkannt werden, was einen Einfluss der Pufferlösung ausschließt. Die Filamente wiesen einen Durchmesser von 10-16 nm auf, womit diese zumindest im Bereich der Durchmesser nativer Fibers (Durchmesser 15-16 nm) liegen. Auch hier sei auf die Arbeit von Audette *et al.* (2004b) verwiesen, welche für die Filamente der N-terminal deletierten Piline ähnliche Durchmesser ermittelte wie für native Typ IV Pili.

Zu klären bleibt die Frage, warum ausschließlich in Polymerisationsansätzen von 4-37°C Filamente dokumentiert werden konnten, handelt es sich doch bei dem Fiberprotein Iho670 um ein ‚hyperthermophiles‘ Protein, welches im nativen Zustand stets Temperaturen von 90°C ausgesetzt ist. Hier könnte die Erklärung im verwendeten heterologen Expressionssystem (*I. hospitalis*-Protein exprimiert in *E. coli*) liegen. Da es sich bei *E. coli* um einen mesophilen, bakteriellen Organismus handelt, kann nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass das synthetisierte, rekombinante Protein eines hyperthermophilen, archaeellen Organismus in allen Charakteristika (Thermostabilität, Faltung, posttranslationale Modifikationen etc.) mit dem nativen Iho670-Protein übereinstimmt. Zahlreiche Abweichungen vom nativen Vorbild konnten bereits für andere hyperthermophile Proteine, die in *E. coli* exprimiert wurden, beobachtet werden (Halio *et al.*, 1996). Zudem zeigte sich, dass rekombinante Proteine hyperthermophiler Mikroorganismen auf die Anwesenheit ihrer nativen Cofaktoren angewiesen sein können, welche eine korrekte Faltung gewährleisten (Albers *et al.*, 2006). Auch diese fehlen in dem hier verwendeten Expressionssystem. Aus diesem Grund ist eine Expression der Iho670-Konstrukte in einem anderen System, z.B. in *S. solfataricus* erwägenswert.

3 Die Ankerstruktur der Fibers von *I. hospitalis* und Fiber-assoziierte Proteine

3.1 Lokalisation der Ankerstruktur

In dieser Arbeit lag ein Schwerpunkt auf der Identifikation, Lokalisation und näheren Beschreibung der Ankerstruktur der Fibers von *I. hospitalis*. Diese Frage wurde einerseits über die Herstellung von Ultradünnschnitten, andererseits über die Analyse von mit den Fibers assoziiert vorliegenden Proteinstrukturen bzw. Komplexen untersucht.

Wie bereits erwähnt, zeigen die Fibers von *I. hospitalis* Ähnlichkeiten mit bakteriellen Typ IV Pili bzw. archaeellen Flagellen, was auf Ähnlichkeiten in deren Verankerungsmechanismus hindeuten könnte. Leider ist vom momentanen Forschungsstand aus nur sehr wenig über die Verankerungsstrukturen dieser beiden Systeme bekannt, so dass Vergleiche schwierig sind. Dennoch gilt aus heutiger Sicht eine Verankerung in oder unterhalb der Cytoplasmamembran als die wahrscheinlichste Theorie, genaue Beschreibungen über deren Aufbau fehlen allerdings (Bardy *et al.*, 2004; Jarrell *et al.*, 2007).

Im Hinblick auf die in *I. hospitalis* beobachteten Strukturen sind sicherlich die Ergebnisse, welche an hochdruckgefrorenen, in Cellulosekapillaren gezüchteten Zellen von *I. hospitalis* erzielt wurden, als jene anzusehen, welche präparationsbedingt dem natürlichen Zustand der intakten Zelle am nächsten kommen. Dies würde eine Verankerung der Fibers in oder unterhalb der Cytoplasmamembran implizieren, da Ultradünnschnitte eindeutig längsgeschnittene Fibers zeigten, welche klar die äußere Membran als auch den periplasmatischen Raum durchquerten. Auch nähere Untersuchungen von Komplexen, welche auf bewachsenen Goldgrids identifiziert werden konnten, legen eine Verankerung unterhalb der cytoplasmatischen Membran nahe. Tomographische Untersuchungen an diesen Komplexen zeigten eine Beteiligung von verschiedenen Membrantypen, von welchen die äußerste durch Immunmarkierungsstudien der äußeren Membran von *I. hospitalis* zugeordnet werden konnte. Bei der darunter liegenden Membran, welche die kugelförmige Struktur, aus der die Fiber entspringt, umhüllt, handelt es sich demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit um die Cytoplasmamembran, was wiederum für eine Fiberverankerung unterhalb der Cytoplasmamembran spricht. In wie weit die analysierten Komplexe noch der nativen Struktur entsprechen, ist unklar, ebenso wie ihre Entstehung. Eine mögliche Entstehungserklärung wäre die Bildung bei der Lyse von *Ignicoccus*-Zellen, was durch eine Eigenschaft von Lipidmembranen, der Bildung von Micellen, geschehen könnte (Edwards *et al.*, 1996; Bond *et al.*, 2004). Infolge der Lyse der *Ignicoccus*-Zellen z. B. durch osmotischen Schock, könnte es zu einem Herauslösen der unter der Cytoplasmamembran lokalisierten Ankerkomplexe kommen, wobei sich die verbleibenden Teile der Cytoplasmamembran wieder micellenförmig um die Ankerstruktur schließen. Ähnliches wäre auch für die äußere

Membran denkbar, die viele der Komplexe als zusätzliche, äußerste Schicht umhüllte. Da die Forschung an archaeeellen Verankerungsstrukturen ein relativ junges Gebiet der Wissenschaft ist und bisher nur wenige hypothetische Verankerungsstrukturen archaeeeller Zellanhänge beschrieben werden konnten, fehlen Vergleichsstrukturen zu der in *I. hospitalis* identifizierten Struktur. Bisher konnten lediglich knopfartige Gebilde an den Enden von isolierten Flagellen von Archaeen, vorzugsweise Methanogenen identifiziert werden, welche allerdings nicht mehr mit den Zellen verbunden waren (Kalmokoff *et al.*, 1988; Chaban *et al.*, 2007). Des Weiteren wurden 1994 von Kupper *et al.* Strukturen aus *Halobacterium salinarum* isoliert, welche als Verankerungspunkt archaeeeller Flagellen vermutet wurden. Diese sogenannten *polar caps* erschienen im Elektronenmikroskop als runde Strukturen, von welchen zahlreiche Flagellen ausgingen, deren genaue Lokalisierung innerhalb der Zelle aber unklar blieb. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen dieser *polar cap* und der von Metlina (2004) beschriebenen scheibenförmigen, lamellaren Struktur (*discoïd lamellar structure*), welche den Verankerungspunkt des Flagellenbündels von *H. salinarum* darstellen soll. Metlina (2004) lokalisierte diese *discoïd lamellar structure* als unterhalb der Cytoplasmamembran gelegene Struktur, welche in Ultradünnschnitten als elektronendichte Linie erschien, die Ähnlichkeiten mit biologischen Membranen aufwies. Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die von Metlina (2004) gezeigten Ultradünnschnitte einen extrem schlechten Zellerhalt widerspiegeln, so dass die *discoïd lamellar structure* als native Struktur in *H. salinarum* zweifelhaft ist, da es sich hier auch um ein präparationsbedingtes Artefakt handeln könnte. Die in *I. hospitalis* gefundene Struktur weist morphologisch mehr Ähnlichkeiten mit den knopfartigen Gebilden auf, dennoch zeigt sie mit ca. 35 nm einen deutlich größeren Durchmesser als die von Kalmokoff *et al.* (1988) beschriebenen Strukturen, was allerdings an der Präparation der methanogenen Flagellen liegen könnte. Eine Organisation in Form einer *discoïd lamellar structure* erscheint dagegen unwahrscheinlich. Einerseits konnten die Fibers in mikroskopischen Analysen (Negativkontrastierung, Gefrierätzung) nie in Bündelform, wie bei den analysierten *H. salinarum*-Zellen, beobachtet werden konnten, andererseits zeigten Ultradünnschnitte von *I. hospitalis* nie elektronendichte Linien unterhalb der Cytoplasmamembran an. Es besteht somit durchaus die Möglichkeit, dass bei *I. hospitalis* ein komplett anderer Verankerungstyp der Zellanhänge vorliegt. Aufgrund der zahlreichen runden und kugeligen Strukturen, die in Zusammenhang mit der Ankerstruktur der Fibers gefunden wurden (vgl. Abb. III.19, III.21, IV.1 und IV.2), wäre unter anderem beispielsweise eine kugellagerartige Verankerung denkbar.

3.2 Fiber-assoziierte Proteine

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten die Fibers von *I. hospitalis* oft in Verbindung mit diversen Proteinstrukturen, welche im Zusammenhang mit einer möglichen Ankerstruktur stehen könnten. In diesem Zusammenhang konnte häufig eine die Fiber umhüllende Struktur beobachtet werden, die einen Durchmesser von ca. 38 nm einnahm und an diversen Fiberabschnitten detektiert wurde. Ähnliche Strukturen konnten bereits an Zellanhängen von *I. pacificus* beobachtet werden. Bei diesem mit *I. hospitalis* nah verwandten Organismus umhüllten diese als IPEPs (*I. pacificus* extracellular particle) bezeichneten Strukturen ebenfalls diverse Fiberabschnitte, waren in Gefrierätzpräparaten auf der äußeren Membran nachweisbar und konnten zudem in Verbindung mit den bei *I. pacificus* ebenfalls festgestellten Komplexen detektiert werden (Meyer, 2007). Ob es sich hier um vergleichbare Proteinaggregate handelt muss offen bleiben, da in beiden Organismen keine biochemischen Daten bezüglich dieser Strukturen existieren. Auch zeigten Gefrierätzpräparate nie die Existenz von ähnlichen Strukturen auf der äußeren Membran von *I. hospitalis* an. Unklar ist auch, ob es sich bei diesen Zusammenlagerungen um einen nativen Zustand oder ein präparationsbedingtes Artefakt handelt, allerdings spricht die Tatsache, dass diese Zusammenlagerungen auch auf bewachsenen Goldgrids nachweisbar waren, eher für die Theorie einer aktiven Zusammenlagerung mit biologischer Funktion. Vorbilder von umhüllenden Flagellenstrukturen sind vor allem innerhalb der Bakterien zu finden. So zeigten beispielsweise *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas stizobii* oder *Bdellovibrio bacteriovorus* sogenannte *flagellar sheaths*, welche als Fortsetzung der Zellhülle angesehen werden können und aus Proteinen und Lipopolysacchariden aufgebaut sind (Geis *et al.*, 1993; Fuerst und Hayward, 1969; Seidler und Starr, 1968; Fuerst und Perry, 1988; Hranitzky *et al.*, 1980; Thomashow und Ritterberg, 1985). Eine eindeutige funktionelle Zuordnung konnte bisher noch nicht getroffen werden, vermutet wird jedoch ein Zusammenhang mit Adhäsion bzw. mit Interaktionen mit bestimmten Oberflächen (Sjoglad *et al.*, 2005). Die in *I. hospitalis* auftauchende, umhüllende Struktur zeigt allerdings weder eine komplette Umhüllung der Fiber noch eine Ähnlichkeit mit der Zellhülle von *I. hospitalis*, so dass ein Zusammenhang mit einer *flagellar sheath* für diese Struktur klar ausgeschlossen werden kann. Eine weitere Flagellen umhüllende Struktur konnten von Trachtenberg und DeRosier (1992) an ca. 10% der Filamente von *Caulobacter crescentus* beobachtet werden. Dabei handelte es sich laut Meinung der Autoren um einzelne Protofilamente, welche sich um die bakterielle Flagelle winden. Auch ein solches Verhalten kann für die Fibers von *I. hospitalis* nicht zutreffen, da durch die Ergebnisse der dreidimensionalen Rekonstruktion eine Bildung von Protofilamenten ausgeschlossen werden konnte. Da die umhüllten Fibers in elektronenmikroskopischen Analysen scheinbar eine höhere Flexibilität besaßen, könnte dies auf einen funktionellen Zusammenhang mit den an der Umhüllung beteiligten Proteinen hindeuten. So

könnten die Proteine der umhüllenden Struktur durch Protein-Protein Wechselwirkungen mit den Iho670-Proteinen eine Konformationsänderung der Fiber auslösen, was eine höhere Flexibilität der Fiber zur Folge haben könnte. Vor allem in solchen Bereichen, in denen die Fiber eine der beiden Membranen durchqueren muss, wäre eine flexiblere Grundstruktur von großem Vorteil, stellt die Fiber an diesen Stellen doch eine Unterbrechung der soliden, regelmäßigen Membranstruktur und somit eine mögliche Bruchstelle dar. Auch die unterschiedlichen Längen (40 nm bis über 1 μm), die für diese Struktur gemessen werden konnten, könnten einen Hinweis auf eine derartige Funktion geben. Geht man davon aus, dass diese Struktur die Fiber vor allem in dem Bereich zwischen der Cytoplasmamembran und der äußeren Membran umhüllt, so sind aufgrund der variablen Ausdehnungen des Periplasmas verschieden lange Abschnitte zu durchqueren, was die unterschiedlichen Längen der Fiber-umhüllenden Struktur erklären könnte.

Ein weiteres, möglicherweise Fiber-assoziiertes Protein stellt Igni_0668 dar. Durch die Herstellung von Antikörpern gegen dieses Protein sollte eine Beteiligung von Igni_0668 am Aufbau der Fiber untersucht werden. Durch Immunmarkierungen an *I. hospitalis*-Zellen, welche Antikörpersignale vor allem an Stellen zeigten, an denen die Fiber die äußere Membran passiert, und welche zudem an gegenüberliegenden Stellen der cytoplasmatischen Membran auftauchten, erscheint eine Beteiligung dieses Proteins am Fiberaufbau durchaus realistisch. Blast Search Analysen ergaben keine signifikanten Homologien zu bekannten Proteinen, wobei die besten Werte für Proteine der Familie der Glykosidhydrolasen erhalten werden konnten. Bei diesen handelt es sich um weit verbreitete Enzyme, welche die hydrolytische Spaltung von Glykosidbindungen katalysieren (Davies und Henrissat, 1995). Ein Zusammenhang mit den Fibers von *I. hospitalis* wäre aufgrund der Tatsache, dass archaeele Flagellen in den meisten Fällen glykosyliert vorliegen, denkbar (Logan, 2006). Zwar konnte über PAS-Färbungsexperimente keine Glykosylierung an den Fibers von *I. hospitalis* nachgewiesen werden (Müller, 2005; Müller *et al.*, 2009), jedoch lässt dies nicht automatisch den Schluss zu, dass keine derartige posttranslationale Modifikation bei den Fibers von *I. hospitalis* auftritt, da konventionelle Färbemethoden nicht immer in der Lage sind, Glykosylierungen zu dokumentieren. Dies konnte an den Zellanhängen von *M. voltae* gezeigt werden, wo NMR-Analysen eine Glykosylierung der Flagelline in Form eines Trisaccharids von einer relativen molaren Masse von 779 Da feststellen konnten, jedoch weder PAS- noch Thymolschwefelsäurefärbungen eine positive Glykosylierungsreaktion anzeigten (Voisin *et al.*, 2005). Somit könnte über eine Deglykosylierung der Iho670-Proteine spekuliert werden, welche von Igni_0668 katalysiert wird. Bereits zuvor wurde darauf verwiesen, dass bakterielle Typ IV Pili im Verlauf der Retraktion einen Abbau der Piline in die Cytoplasmamembran erfahren, welche im Anschluss wieder zum Aufbau neuer Typ IV Pili herangezogen werden können (Morand *et al.*, 2004; Skerker und Berg, 2001). Wenn nun

auch die Fibers von *I. hospitalis* einen Abbau erfahren würden, könnte das Protein Igni_0668 die hypothetische Glykosylierung der Iho670-Proteine entfernen, so dass die Monomere wieder in beide Membranen eingebaut werden könnten. Diese Theorie könnte auch die Lokalisation der Igni_0668-Proteine an direkt untereinander liegenden Stellen der beiden Membranen erklären.

Denkbar wäre auch eine Funktion ähnlich zu der von PilQ, welches in Typ IV Pili einen Komplex in der äußeren Membran formt, durch welchen der Pilus an die Oberfläche der Zellen geleitet wird (Collins *et al.*, 2005). Dies könnte auch auf eine Funktion der Fibers in Bezug auf DNA-Aufnahme und somit auf Transformationsgeschehnisse hinweisen, da auch für PilQ die Fähigkeit, DNA zu binden und in die Zelle zu leiten, beschrieben ist (Assalkhou *et al.*, 2007). Da die Ankerstruktur der Fibers, wie in Ultradünnschnitten gezeigt, unterhalb der Cytoplasmamembran liegt, muss die Fiber zusätzlich die cytoplasmatische Membran passieren, was eine Lokalisation des Igni_0668-Proteins auch in der cytoplasmatischen Membran rechtfertigen würde. Nicht zuletzt wäre ein Zusammenhang mit der umhüllenden Struktur denkbar, welche zuvor im Hinblick auf eine Erhöhung der Flexibilität diskutiert wurde. Aufgrund der wahrscheinlichen Assoziation von Igni_0668 mit der Fiber von *I. hospitalis* erscheint auch eine genauere Untersuchung der Proteine Igni_0669 bis Igni_0677 sinnvoll; zumindest schließen Podar *et al.* (2008) aus der Genomanalyse, dass die Gene *igni_0668* bis *igni_0677* counterclockwise transkribiert werden, was auf eine Organisation innerhalb eines Operons hinweist. Somit ergibt sich auch für diese Proteine die Möglichkeit einer Beteiligung an der Fiberbildung.

Als letzter Punkt sollen an dieser Stelle die Ergebnisse, welche über Co-IP Experimente mit dem rabbit anti-Iho670 Antikörper erhalten wurden, diskutiert werden. Dabei konnten insgesamt 14 Proteine identifiziert werden, welche eventuell in Zusammenhang mit den Fibers von *I. hospitalis* stehen. Grundsätzlich zeigt das Auftauchen von Proteinen, welche der äußeren Membran, der cytoplasmatischen Membran als auch dem Cytoplasma zugeordnet werden können, dass die Fibers bzw. die Iho670-Proteine mit all diesen Zellkompartimenten in Kontakt stehen, was bereits in Zusammenhang mit der Analyse der Komplexstrukturen (siehe Kap. III.4) oder den Immunmarkierungsexperimenten (siehe Kap. III.2 und Kap. III.5.3) beobachtet werden konnte. Dabei spielt das Thermosom mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Rolle bei der Verhinderung der Aggregation der neu synthetisierten und unprozessierten Fiberproteine, wie es bereits für Flagelline der archaellen Flagellen bekannt ist. Deren Aggregation wird durch Interaktion mit cytoplasmatischen Chaperonen unterbunden, wobei sich ein Intermediat aus beiden Strukturen bildet, was wiederum eine unspezifische Aggregation der Preflagelline über Wechselwirkungen ihrer hydrophoben N-Termini verhindert (Kostyukova *et al.*, 1994; Jarrell *et al.*, 1996). Die beiden Proteine der A-Typ ATP Synthase (subunits A und I, Küper *et al.*, 2010; annotiert als V-Typ ATPase) dienen

wohl dazu ATP für die Fiber bereitzustellen, das beispielsweise für Transportvorgänge genutzt werden könnte. Auch ein Zusammenhang mit der Bereitstellung von Energie für Polymerisationsvorgänge wäre denkbar, da Ähnliches bereits von Bose *et al.* (2002) für Pili und Pilus-ähnliche Strukturen vermutet wurde. Als mögliche ATPase konnte in diesem Zusammenhang Igni_1009 über Blast Search Analysen identifiziert werden, welche Homologien zu ATPasen des Typ II bzw. Typ IV Sekretionssystems aufweist (Daten nicht gezeigt, Score-Werte 283-417). Eine Beteiligung dieser ATPase am Antrieb kann nach momentanem Wissensstand ausgeschlossen werden. Auch die über IP identifizierte Untereinheit B der Sulfidreduktase könnte an der ATP-Bildung beteiligt sein, da Küper *et al.* (2010) zeigen konnten, dass in *I. hospitalis* eine H₂-Schwefeloxidorreduktase für die Erzeugung des elektrochemischen Gradienten zuständig ist, welcher für die ATP-Bildung essentiell ist. Die Annotation des identifizierten Proteins ist allerdings zweifelhaft, zudem konnte es von Kletzin *et al.* bisher nicht als Bestandteil des H₂-Schwefeloxidorreduktase-Komplexes identifiziert werden (A. Kletzin, TU Darmstadt, persönliche Mitteilung). Unklar ist allerdings, wie das erzeugte ATP zu der Fiberbasis gelangt, da sowohl der ATP-Synthasekomplex als auch der H₂-Schwefeloxidorreduktasekomplex überwiegend in der äußeren Membran lokalisiert wurden (Küper *et al.*, 2010). Mögen zwar diese beiden Komplexe die Energie für bestimmte Prozesse in den Fibers bereitstellen, sind sie doch nicht als direkter Bestandteil der Fibers anzusehen. Vielmehr ist davon auszugehen, dass es bei der IP zu einer Fällung von kleinen Membranpartikeln kam, welche mit den membran-assoziierten Iho670-Proteinen gefällt wurden. Dies erklärt auch das Vorhandensein von Proteinen der äußeren und der cytoplasmatischen Membran, da Iho670 im Laufe dieser Arbeit als Bestandteil beider Membranen identifiziert werden konnte. Interessant ist das Auftauchen der Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, welches eigentlich ein Enzym der Glykolyse ist, jedoch auch als Adhäsion beschrieben werden konnte (Wang und Lu, 2007; Bergmann *et al.*, 2004; Brassard *et al.*, 2004). In dieser Rolle wird die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase verdächtigt, bei den ersten Schritten der bakteriellen Adhäsion an Wirtszellen beteiligt zu sein. Diese Funktion könnte auch in *I. hospitalis* eine Rolle spielen, was indirekt auf eine Verbindung zu den Fibers hindeutet, da auch diese mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Rolle bei der Adhäsion spielen. Ob die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase lediglich in der äußeren Membran lokalisiert ist oder gar am Aufbau der Fibers beteiligt ist, muss offen bleiben und bedarf genauerer Analysen. Allerdings ist eher von ersterer Theorie auszugehen, da auch hier die Möglichkeit besteht, dass dieses Protein dadurch identifiziert wurde, dass kleine Membranpartikel gefällt wurden, aus welchen das Iho670-Protein nicht herausgelöst werden konnte. Ähnliches ist für die restlichen annotierten Proteine, die über IP identifiziert wurden, denkbar. Ausnahmen bleiben die Proteine Igni_0847 und Igni_0955, welche als hypothetische Proteine annotiert sind. Zwar konnten

FlaFind Analysen an beiden Proteinen kein Typ IV Pilin-ähnliches Signalpeptid detektieren, jedoch schließt dies eine Beteiligung an der Fiberbildung nicht aus.

3.3 Die hypothetische Verankerungsstruktur der Iho670 Fibers

Fasst man alle Daten der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zusammen, könnte sich folgendes, hypothetisches Bild der Verankerungsstruktur der Iho670 Fibers ergeben: Ausgangspunkt der Fiber wäre demnach eine runde oder kugelförmige Struktur, aus der sich die Fiber erstreckt (vgl. Abb. III.21). Dabei könnte diese Struktur entweder aus Iho670-Proteinen, oder aus bisher unidentifizierten Proteinen bestehen. Was sich im Zentrum dieser Struktur befindet, kann nicht klar beantwortet werden, möglicherweise sind an dieser Stelle Proteine lokalisiert, die die Basis der Fiber bilden, oder man findet dort Andockstellen für Proteine, welche im weiteren Verlauf in das Fiberfilament bzw. die Basis eingefügt werden. Auch der Sitz der hypothetischen ATPase Igri_1009 wäre an dieser Stelle denkbar. Um den Anfangsbereich der Fiber könnte sich darauffolgend die umhüllende Struktur befinden, in deren Mitte die Fiber liegt. Dabei besteht durchaus die Möglichkeit, dass diese umhüllende Struktur auch die rund-/kugelförmige Ausgangsstruktur umschließt (vgl. Abb. III.17 B). Auch über die Funktion dieser umhüllenden Struktur kann momentan nur spekuliert werden, denkbar wäre ein funktioneller Zusammenhang, der mit einer Erhöhung der Flexibilität einhergeht, oder eine Funktion als Stabilisator der Ankerstruktur (vgl. Kap. IV.3.2). Die Ausdehnung dieser umhüllenden Struktur ist momentan nicht klar zu definieren; denkbar wäre eine Umhüllung, die sich nur um den Anfangsbereich der Fiber erstreckt, andererseits wäre auch eine Ausdehnung durch den periplasmatischen Raum bis hin zur äußeren Membran denkbar. Berücksichtigt man die Ergebnisse, die bei der Analyse der Komplexstrukturen erzielt wurden, könnte der Fiberanker zusätzlich von einer kugeligen Proteinstruktur umschlossen werden, in dessen Zentrum der gesamte Ankerkomplex liegt (vgl. Abb. VI.2, blaue Struktur). Viele dieser Strukturen wiesen zudem längliche Fortsätze auf (vgl. Kap. III.4.1), was auf eine mögliche Verankerung oder ‚Aufhängung‘ dieser Struktur in oder an der Cytoplasmamembran deuten könnte. So könnte beispielsweise die kugelige Proteinstruktur den Fiberanker innerhalb des Cytoplasmas umschließen und der längliche Fortsatz eine Verbindung zur Cytoplasmamembran darstellen. Durch eine derartige Assoziation mit der Cytoplasmamembran könnte eine sowohl flexible als auch stabile Verankerung der Fiberbasis innerhalb des Cytoplasmas erreicht werden. Allerdings sind an dieser Stelle noch zahlreiche biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen von Nöten, um definitivere Aussagen über diesen scheinbar einzigartigen Ankerkomplex der Iho670 Fibers von *I. hospitalis* zu treffen.

V Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Fibers von *I. hospitalis* durchgeführt. Des Weiteren konnten tiefere Einblicke in den Verankerungsmechanismus dieser Zellanhänge erhalten sowie eine genaue Lokalisation der Iho670-Proteine innerhalb der Zelle getroffen werden.

Anhand mehrerer Ergebnisse war es möglich, die Fibers von *I. hospitalis* als Strukturen zu charakterisieren, welche Ähnlichkeiten mit bakteriellen Typ IV Pili aufweisen. Dies gründet sich auf die Existenz von hydrophoben N-terminalen Bereichen des Fiberproteins Iho670, welche durch Interaktionen miteinander das Grundgerüst der Fiber bilden. Zudem konnten starke Interaktionen der globulären Domänen der Iho670-Proteine nachgewiesen werden, welche Stabilität innerhalb der Fiber gewährleisten könnten. Polymerisationsexperimente mit rekombinanten Fiberproteinen *in vitro* zeigten, dass die Existenz dieser N-terminalen Bereiche nicht essentiell für ein Polymerisationsgeschehen ist, da dieses auch durch eine starke Interaktion der globulären Domänen untereinander ermöglicht werden könnte und Ansätze für eine Nutzung der Fibers als *Nanotubes* bietet. Mit Igni_1405 konnte weiterhin eine aktive Peptidase identifiziert werden, welche in der Lage ist, archaeele Flagelline als auch Piline zu prozessieren.

Immunmarkierungsexperimente mit polyklonalen Antikörpern ermöglichten eine genaue Lokalisation des Hauptfiberproteins Iho670, welches zu großen Teilen sowohl in der äußeren Membran als auch in der cytoplasmatischen Membran von *I. hospitalis* nachgewiesen werden konnte. Kreuzreaktionsexperimente mit der Co-Kultur Kin4/M zeigten, dass die Möglichkeit besteht, dass *N. equitans* neben Lipiden und Aminosäuren auch Bestandteile der Fibers von seinem Wirt *I. hospitalis* bezieht, was für eine noch engere Interaktion beider Organismen zueinander spricht als bislang angenommen.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Ultradünnschnitten schlossen eine Verankerung der Fibers innerhalb der äußeren Membran und des periplasmatischen Raumes aus, vielmehr konnte eine mögliche Verankerungsstelle unterhalb der Cytoplasmamembran identifiziert werden, was durch tomographische Analysen an Komplexen lysierter Zellen, aus welchen sich die Fibers erstreckten, bestätigt wurde. Es konnten Proteine und Proteinkomplexe unbekannter Zusammensetzung identifiziert werden, welche mit der Fiber assoziiert vorlagen. Zudem konnte mit Igni_0668 ein Protein beschrieben werden, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Rolle bei der Fiberassemblierung spielt. Durch elektronenmikroskopische Analysen ergab sich das Bild einer wohl seither einzigartigen Verankerungsstruktur eines archaeeen Zellanhangs. Eine definitive funktionelle Zuordnung der Fiber konnte nicht getroffen werden, dennoch gibt es zahlreiche Hinweise, die eine Adhäsionsfunktion der Fiber implizieren, was durch weiterführende Experimente zu klären ist.

VI Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

Chemische Elementsymbole wurden gemäß der IUPAC-Richtlinien verwendet.

Å	Angström
A	Aceton
AA	Acrylamid
AFS 2	<i>Automatic freeze substitution system</i>
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BBR	Bakterienbank Regensburg
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphat
BG	Bewachsene (kohlebeschichtete) Goldgrids
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C	Cytoplasma
CCD	<i>Charged coupling device</i>
CM	Cytoplasmamembran, cytoplasmatische Membran
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CW	<i>Cell wall</i> , Zellwand
3D	Dreidimensional
DDSA	Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid
DMP-30	Tridimethlyaminomethylphenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	D,L-Dithiothreitol
EC	Extrazellulär
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFU	Substitutionslösung für Gefriersubst.: Ethanol/Glutaraldehyd/Formaldehyd/Uranylacetat
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß(e)
ESI	<i>Electron spray ionization</i>
ESI Nano-LC MS/MS	Flüssigkeitschromatographie mit anschließender Tandem-Massenspektrometrie
et al.	<i>et alii/et aliae</i> , und andere
F	Flagelle
Fi	Fiber
FEG	<i>Field emission gun</i>
FS	<i>Freeze substitution</i> , Gefriersubstitution
h	Stunde

HPF	<i>High pressure freezing</i> , Hochdruckgefrierung
IgG	Immunglobulin G
Ihomp	<i>Ignicoccus hospitalis outer membrane protein</i>
IHRSR	<i>Iterative helical real space reconstruction</i>
IP	Immunpräzipitation
IPEP	<i>Ignicoccus pacificus extracellular particle</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilo Dalton = 1000 g/mol
L	Linksgedreht, linkshändig
LB	Luria-Bertani
LC	Flüssigkeitschromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
LEW	<i>Lysis equilibration wash</i>
MALDI-MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation mass spectrometry</i>
MES	2-(N-Morpholino-) Ethansulfonsäure
MM	Magermilch
MNA	Methylnadic Anhydrid
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
mwco	<i>Molecular weight cut off</i>
NA	Numerische Apertur
NBT	<i>Nitro blue tetrazolium</i>
OD	Optische Dichte
OM	<i>Outer membrane</i> , äußere Membran
p.a.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PbCi	Bleicitrat
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBG	<i>Phosphate buffered gelatine</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
pH	<i>pondus hydrogenii</i> (Wasserstoff-Exponent)
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
Polym.	Polymerisation
PP	Periplasma
PPV	Periplasmatisches Vesikel
pre	unprozessiert(es)
prim.	primär(er)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Rechtsgedreht, rechtshändig
rek.	Rekombinant
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

S	Sedimentationskoeffizient
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
sek.	sekundär(er)
SME	Synthetisches Meerwasser
sp.	Spezies
sv	Serovar, Kurzform von <i>Serovarietas</i>
T	Cannulae
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TED	Tris-carboxymethyl Ethylene Diamine
(T)EM	(Transmissions-) Elektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOF	<i>Time of flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	<i>Transformation & storage solution</i>
TTR	Transthyretin
UAc	Uranylacetat
UK	<i>Unknown</i>
UPM	Umdrehungen pro Minute
US	Ultradünnschnitt
UZ	Ultrazentrifugation bzw. Ultrazentrifuge
Vol.	Volumen
v/v bzw. w/v	Volumen pro Volumen bzw. Gewicht pro Volumen
WBP	<i>weighted-back-projection</i>

2 Begleit-CD

Die Begleit-CD ist auf der Innenseite des rückwärtigen Umschlags angeheftet. Da einige Abbildungen in dieser Arbeit druckerbedingt nicht optimal wiedergegeben werden konnten, ist die Arbeit zusätzlich als PDF-Datei angehängt. Zur besseren Übersicht ist in folgender Abbildung die Orderstruktur der Begleit-CD dargestellt:



Abb. VI.1: Ordnerstruktur der Begleit-CD

3 Zusätzliche Abbildungen

Alle hier dargestellten Daten finden sich zusätzlich in Form eines Videos auf der Begleit-CD.

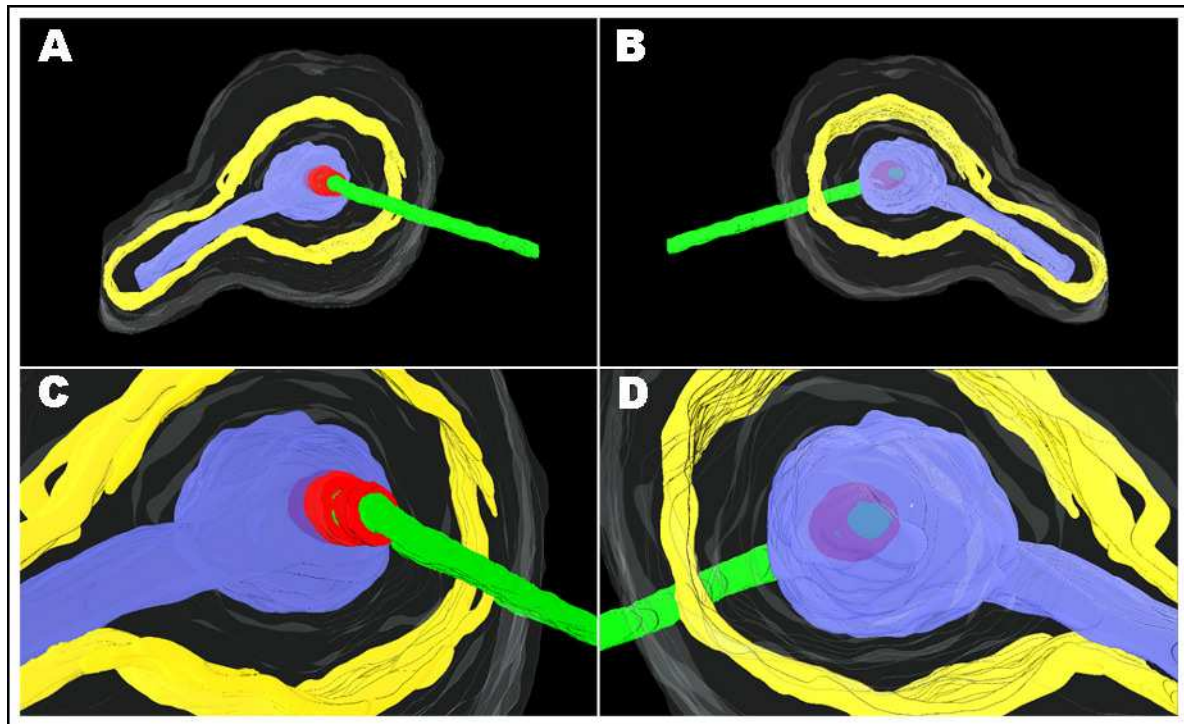


Abb. VI.2: *SurfaceView*-Darstellung des tomographierten Komplexes aus Kap. III.4.2 in verschiedenen Ansichten, A: Übersichtsansicht von unten; B: Übersichtsaufsicht von oben; C: vergrößerte Darstellung des zentralen Komplexbereiches von unten; D: vergrößerte Darstellung des zentralen Komplexbereiches als Aufsicht; Farbgebung: grün: Fiber, rot: Fiber-umhüllende Struktur, blau (transparent): kugelige Struktur aus welcher sich Fiber erstreckt, gelb: Cytoplasmamembran, nur im Umriss dargestellt (nicht ausgefüllt); grau (transparent): äußere Membran

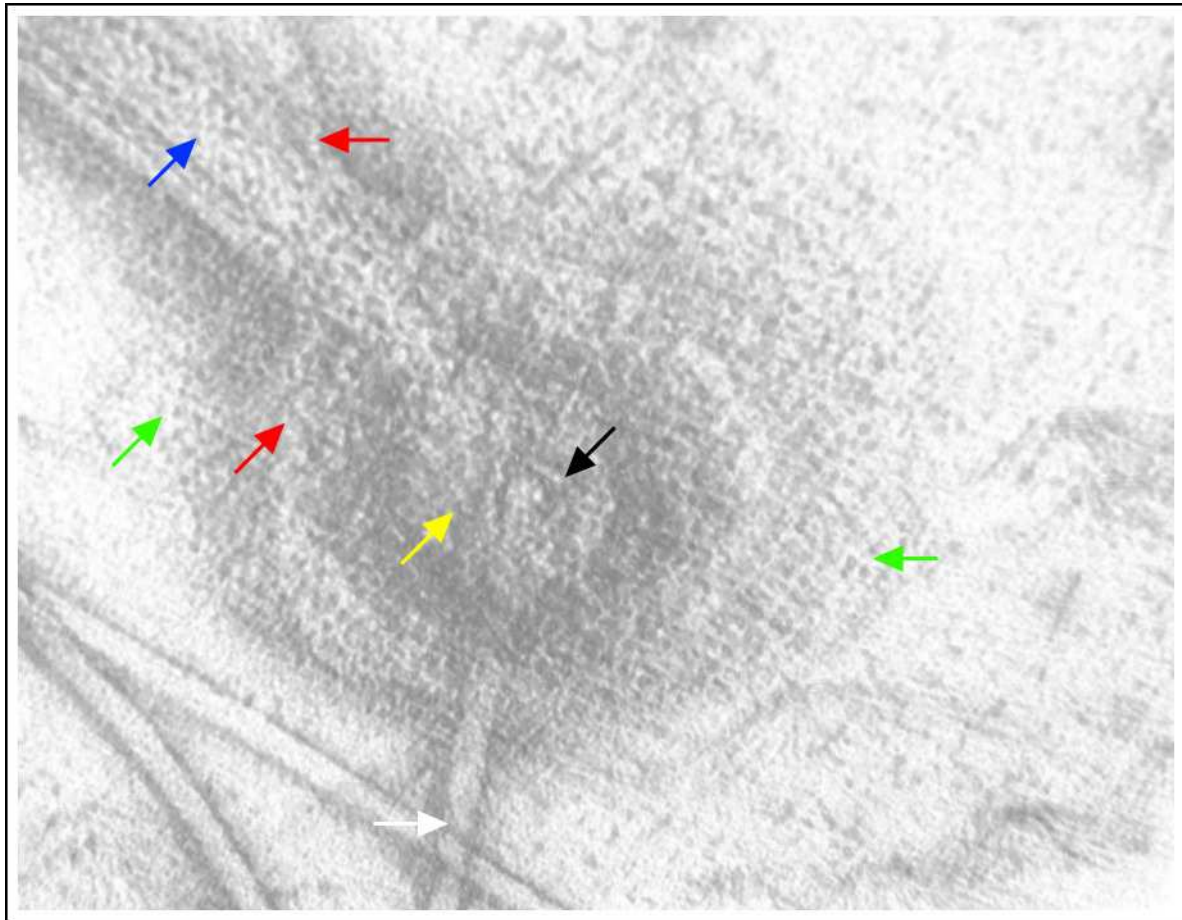


Abb. VI.3: *Vortex*-Darstellung des tomographierten Komplexes aus Kap. III.4.2; Farbgebung der Pfeile analog Abb. III.19, weiß: Fiber, schwarz: Fiber-umhüllende Struktur, gelb: kugelige Struktur aus welcher sich Fiber erstreckt, blau: Fortsatz der kugeligen Struktur aus der sich die Fiber erstreckt, rot: Cytoplasmamembran, grün: äußere Membran

VII Literaturverzeichnis

Albers S.-V., Szabó Z. und Driessen A.J. (2003): Archaeal homolog of bacterial type IV prepilin signal peptidases with broad substrate specificity

J. Bacteriol., **185**, 3918-3925

Albers S.-V. und Driessen J.M. (2005): Analysis of ATPases of putative secretion operons in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*

Microbiol., **151**, 763-773

Albers S.-V., Jonuscheit M., Dinkelaker S., et al. (2006): Production of recombinant and tagged proteins in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*

Appl. Environ. Microbiol., **72**, 102-111

Albers S.-V. und Pohlschröder M. (2009): Diversity of archaeal type IV pilin-like structures

Extremophiles, **13**, 4403-410

Alberts B., Johnson A., Lewis J., et al. (2002): Molecular biology of the cell

Garland Science, 4th edition, New York

Allen G. (1989): Sequencing of proteins and peptides

In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology

Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford

Alonso A.C., Zaidi T., Novak M., et al. (2001): Hyperphosphorylation induces self-assembly of τ into tangles of paired helical filaments/straight filaments

PNAS, **98**, 6923-6928

Asakura S., Eguchi G. und Iino T. (1964): Reconstruction of bacterial flagella *in vitro*

J. Mol. Biol., **10**, 42-56

Assalkhou R., Balasingham S., Collins R.F., et al. (2007): The outer membrane secretin PilQ from *Neisseria meningitidis* binds DNA

Microbiol., **153**, 1593-1603

Audette G.F., Irvin R.T. und Hazes B. (2004a): Crystallographic analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* strain K122-4 monomeric pilin reveals a conserved receptor-binding architecture

Biochem., **43**, 11427-11435

Audette G.F., van Schaik E.J., Hazes B. und Irvin R.T. (2004b): DNA-binding protein nanotubes: learning from nature's nanotech examples

Nano Lett., **4**, 1897-1902

Auvarry F., Thomas J., Fraser G.M. und Hughes C. (2001): Flagellin polymerisation control by a cytosolic export chaperone

J. Mol. Biol., **308**, 221-229

- Baer M.L., Ravel J., Piñeiro S.A., et al. (2004):** Reclassification of salt-water *Bdellovibrio* sp. as *Bacteriovorax marinus* sp. nov. and *Bacteriovorax litoralis* sp. nov.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **54**, 1011-1016
- Bally M., Filloux A., Akrim M., et al. (1992):** Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of seven *xcp* genes and processing of secretory apparatus components by prepilin peptidase
Mol. Microbiol., **6**, 1121-1131
- Bardy S.L., Mori T., Komoriya K., et al. (2002):** Identification and localization of flagellins FlaA and FlaB3 within the flagella of *Methanococcus voltae*
J. Bacteriol., **184**, 5223-5233
- Bardy S.L., Ng S.Y. and Jarrell K.F. (2003):** Procaryotic motility structures
Microbiology, **149**, 295-304
- Bardy S.L., Ng S.Y. und Jarrell K.F. (2004):** Recent advances in the structure and assembly of the archaeal flagellum
J. Mol. Microbiol. Biotechnol., **7**, 41-51
- Bayley D.P. und Jarrell K.F. (1998):** Further evidence to suggest that archaeal flagella are related to bacterial type IV pili
J. Mol. Evol., **46**, 370-373
- Berg H.C. (2003):** The rotary motor of bacterial flagella
Annu. Rev. Biochem., **72**, 19-54
- Berg H.C. (2008):** Bacterial flagellar motor
Curr. Biol., **18**, R689-691
- Berg H.C. und Anderson R.A. (1973):** Bacteria swim by rotating their flagella
Nature, **245**, 380-382
- Bergmann S., Rohde M. und Hammerschmidt S. (2004):** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein
Infect. Immun., **72**, 2416-2419
- Blair D.F. (2003):** Flagellar movement driven by proton translocation
FEBS Lett., **545**, 86-95
- Blum H., Beier H. und Gross H.J. (1987):** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels
Electrophoresis, **8**, 93-99
- Bond P.J., Cuthbertson J.M., Deol S.S. und Sansom M.S.P. (2004):** MD simulation of spontaneous membrane protein/detergent micelle formation
J. Am. Chem. Soc., **126**, 15948-15949

- Bose N., Payne S.M. und Taylor R.K. (2002):** Type IV pilus biogenesis and type II-mediated protein secretion by *Vibrio cholerae* occur independently of the TonB-facilitated proton motive force
J. Bacteriol., **184**, 2305-2309
- Bradford M.M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
Anal. Biochem., **40**, 502-511
- Brassard J., Gottschalk M. und Quessy S. (2004):** Cloning and purification of the *Streptococcus suis* serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin
Vet. Microbiol., **102**, 87-94
- Burghardt T. (2008):** Einblicke in die Interaktion zwischen *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*: Das Membranprotein Ihomp1 sowie Nachweis weiterer Proteine der Zellhüllen
Dissertation, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Burghardt T., Näther D.J., Junglas B., et al. (2007):** The dominating outer membrane protein of the hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus hospitalis*: a novel pore-forming complex
Mol. Microbiol., **63**, 166-176
- Cao B., Porollo A., Adamczak R., et al. (2006):** Enhanced recognition of protein transmembrane domains with prediction-based structural profiles
Bioinformatics, **22**, 303-309
- Chaban B., Ng S.Y.M., Kanbe M., et al. (2007):** Systematic deletion analyses of the *fla* genes in the flagella operon identify several genes essential for proper assembly and function of flagella in the archaeon, *Methanococcus maripaludis*
Mol. Microbiol., **66**, 596-609
- Chung C.T., Niemela S.L. und Miller R.H. (1989):** One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution
PNAS, **86**, 2172-2175
- Clausen M., Jakovljevic V., Søgaard-Andersen L. und Maier B. (2009):** High-force generation is a conserved property of type IV pilus systems
J. Bacteriol., **191**, 4633-4638
- Cohen-Krausz S. und Trachtenberg S. (2002):** The structure of the archaeobacterial flagellar filament of the extreme halophile *Halobacterium salinarum* R1M1 and its relation to eubacterial flagellar filaments and type IV pili
J. Mol. Biol., **321**, 383-395
- Cohen-Krausz S. und Trachtenberg S. (2008):** The flagellar filament structure of the extreme acidothermophile *Sulfolobus shibatae* B12 suggests that archaeobacterial flagella have a unique and common symmetry and design
J. Mol. Biol., **375**, 1113-1124

Cohn F. (1872): Untersuchungen über Bakterien

Beitr. Biol. Pflanz., **1**, 127-244

Collins R.F., Frye S.A., Balasingham S., et al. (2005): Interaction with type IV pili induces structural changes in the bacterial outer membrane secretin PilQ

J. Biol. Chem., **280**, 18923-18930

Comanducci M., Bambini S., Brunelli B., et al. (2002): NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*

J. Exp. Med., **195**, 1445-1454

Cornwell G.G. III, Sletten K., Johansson B. und Westermark P. (1988): Evidence that the amyloid fibril protein in senile systemic amyloidosis is derived from normal prealbumin

Biochem. Biophys. Res. Commun., **154**, 648-653

Craig L., Taylor R.K., Pique M.E., et al. (2003): Type IV pilin structure and assembly

Mol. Cell, **11**, 1139-1150

Craig L., Volkmann N., Arval A.S., et al. (2006): Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions

Mol. Cell, **23**, 651-662

Dallinger W.H. und Drasedale J. (1875): Further researches into the Life History of the Monads

The Monthly M. J., **13**, 185-197

Davies G. und Henrissat B. (1995): Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases

Structure, **3**, 853-859

de Garcini E.M., Serrano L. und Avila J. (1986): Self assembly of microtubule associated protein tau into filaments resembling those found in alzheimer disease

Biochem. Biophys. Res. Commun., **141**, 790-796

Desmond E., Brochier-Armanet C. und Gribaldo S. (2007): Phylogenomics of the archaeal flagellum: rare horizontal gene transfer in a unique motility structure

BMC Evol. Biol., **7**, 106-118

Doddema H.J., Derksen J.W.M. und Vogels G.D. (1979): Fimbriae and flagella of methanogenic bacteria

FEMS Microbiol. Lett., **5**, 135-138

Edwards D.A., Schneck F., Zhang I., et al. (1996): Spontaneous vesicle formation at lipid bilayer membranes

Biophys. J., **71**, 1208-1214

Egelman E.H. (2007): The iterative real space reconstruction method: Surmounting the problems posed by real polymers

J. Struct. Biol., **157**, 83-94

Ehrenberg Ch.G. (1838): Die Infusionstierchen als vollkommene Organismen

Voss L., Leipzig

Faguy D.M. und Jarrell K.F. (1999): A twisted tale: the origin and evolution of motility and chemotaxis in prokaryotes

Microbiology, **145**, 279-281

Fariselli P., Finelli M., Marchignoli D., et al. (2003): MaxSubSeq: an algorithm for segment-length optimization. The case study of the transmembrane spanning segments

Bioinformatics, **19**, 500-505

Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., et al. (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules

Science, **246**, 64-71

Frank M. (2006): Untersuchung der Fimbrien von *Methanothermobacter thermoautotrophicus* AG5

Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg

Fricke H., Giere O., Stetter K., et al. (1989): Hydrothermal vent communities at the shallow subpolar Mid-Atlantic ridge

Mar. Biol., **102**, 425-429

Fröls S., Gordon P.M., Panlilio M.A., et al. (2007): Response of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* to UV damage

J. Bacteriol., **189**, 8708-8718

Fröls S., Ajon M., Wagner M., et al. (2008): UV-inducible cellular aggregation of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by pili formation

Mol. Microbiol., **70**, 938-952

Fuerst J.A. und Hayward A.C. (1969): The sheathed flagellum of *Pseudomonas stizolobii*

J. Gen. Microbiol., **58**, 239-245

Fuerst J.A. und Perry J.W. (1988): Demonstration of lipopolysaccharide on sheathed flagella of *Vibrio cholerae* O:1 by protein A-gold immunoelectron microscopy

J. Bacteriol., **170**, 1488-1494

Galkin V.E., Yu X., Bielnicki J., Heuser J., et al. (2008): Divergence of quaternary structures among bacterial flagellar filaments

Science, **320**, 382-385

Geis G., Suerbaum S., Forsthoff B., et al. (1993): Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*

J. Med. Microbiol., **38**, 371-377

Gerl L., Deutzmann R. und Sumper M. (1989): Halobacterial flagellins are encoded by a multigene family. Identification of all five gene products

FEBS Lett., **244**, 137-140

- Goldsteins G., Persson H., Andersson K., et al. (1999):** Exposure of cryptic epitopes on transthyretin only in amyloid and in amyloidogenic mutants
PNAS, **96**, 3108-3113
- Gómez-Duarte O.G., Ruiz-Tagle A., Gómez D.C., et al. (1999):** Identification of *IngA*, the structural gene of longus type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*
Microbiol., **145**, 1809-1816
- Häring M. (2005):** Isolierung und Charakterisierung neuer Viren von Hyperthermophilen
Dissertation, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Hansen J.K. und Forest K.T. (2006):** Type IV pilin structures: insights on shared architecture, fiber assembly, receptor binding and type II secretion
J. Mol. Microbiol. Biotechnol., **11**, 192-207
- Halio S.B., Blumentals I.I., Short S.A., et al. (1996):** Sequence, expression in *Escherichia coli*, and analysis of the gene encoding a novel intracellular protease (Pfpl) from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*
J. Bacteriol., **178**, 2605-2612
- Harlow E. und Lane D. (1988):** Antibodies – a laboratory manual
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Hasegawa K., Yamashita I. und Namba K. (1998):** Quasi- and nonequivalence in structure of bacterial flagellar filament
Biophys. J., **74**, 569-575
- Hazes B., Sastry P.A., Hayakawa K., et al. (2000):** Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin suggests a mainchain-dominated mode of receptor binding
J. Mol. Biol., **299**, 1005-1017
- Heimerl T. (2009):** Ultrastruktur der Co-Kultur Kin4/M: Serienschritte, 3D-Modelle und Immunmarkierungsversuche
Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Henrichsen J. (1975):** The occurrence of twitching motility among gram-negative bacteria
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect., **B 83**, 171-178
- Hirokawa T. (1998):** SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins
Bioinformatics, **14**, 378-379
- Hofman K. und Stoffel W. (1993):** TMbase – a database of membrane spanning protein segments
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, **374**, 166
- Hoiczky E., Roggenkamp A., Reichenbecher M., et al. (2000):** Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins
EMBO J., **19**, 5989-5999

- Horn C., Paulmann B., Kerlen G., et al. (1999):** In vivo observation of cell division of anaerobic hyperthermophiles by using a high-intensity dark-field microscope
J. Bacteriol., **181**, 5114-5118
- Hranitzky K.W., Mulholland A., Larson A.D., et al. (1980):** Characterization of flagellar sheath protein in *Vibrio cholerae*
Infect. Immun., **27**, 597-603
- Huber H., Burggraf S., Mayer T., et al. (2000):** *Ignicoccus* gen. nov, a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic Archaea, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp. nov. and *Ignicoccus pacificus* sp. nov.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **50**, 2093-2100
- Huber H., Hohn M.J., Stetter K.O. und Rachel R. (2003):** The phylum Nanoarchaeota: Present knowledge and future perspectives of a unique form of life
Res. Microbiol., **154**, 165-171
- Hyman H.C und Trachtenberg S. (1991):** Point mutations that lock *Salmonella typhimurium* flagellar filaments in the straight right-handed and left-handed forms and their relation to filament superhelicity
J. Mol. Biol., **220**, 79-88
- Idia Y., Hobley L., Lambert C., et al. (2009):** Roles of multiple flagellins in flagellar formation and flagella growth post bdelloplast lysis in *Bdellovibrio bacteriovorus*
Mol. Biol., **394**, 1011-1021
- Ikeda T., Kamiya R. und Yamaguchi S. (1984):** *In vitro* polymerization of flagellin excreted by a short-flagellum *Salmonella typhimurium* mutant
J. Bacteriol., **159**, 787-789
- Inio T. (1969):** Polarity of flagellar growth in *Salmonella*
J. Gen. Microbiol. **56**, 227-239
- Jahn U., Gallenberger M., Paper W., et al. (2008):** *Nanoarchaeum equitans* and *Ignicoccus hospitalis*: New insights into a unique, intimate association of two archaea
J. Bacteriol., **190**, 1743-1750
- Jahn U., Summons R., Sturt H., et al. (2004):** Composition of the lipids of *Nanoarchaeum equitans* and their origin from its host *Ignicoccus* sp. strain KIN4/I
Arch. Microbiol., **182**, 404-413
- Jarrell K.F., Bayley D.P. und Kostyukova A.S. (1996):** The archaeal flagellum: a unique motility structure
J. Bacteriol., **178**, 5057-5064
- Jarrell K.F., Ng S.Y.F. und Chaban B. (2007):** Flagellation and chemotaxis
In: Archaea: Molecular and cellular biology
ASM Press, Washington, USA

- Jarrell K.F. und McBride M.J. (2008):** The surprisingly diverse ways that prokaryotes move
Nat. Rev. Microbiol., **6**, 466-476
- Jaschke M., Butt H.-J. und Wolff E.K. (1994):** Imaging flagella of halobacteria by atomic force microscopy
Analyst, **119**, 1943-1946
- Jones C.J. und Aizawa S. (1991):** The bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly and function
Adv. Microb. Physiol., **32**, 109-172
- Jun H.-S., Qi M., Gong J., et al. (2007):** Outer membrane proteins of *Fibrobacter succinogenes* with potential roles in adhesion to cellulose and in cellulose digestion
J. Bacteriol., **189**, 6806-6815
- Junglas B., Briegel A., Burghardt T., et al. (2008):** *Ignicoccus hospitalis* and *Nanoarchaeum equitans*: ultrastructure, cell-cell interaction, and 3D reconstruction from serial sections of freeze-substituted cells and by electron cryotomography
Arch. Microbiol., **190**, 395-408
- Käll L., Krogh A. und Sonnhammer E.L.L. (2004):** A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method
J. Mol. Biol., **338**, 1027-1036
- Kalmokoff M.L., Jarrell K.F. und Koval S.F. (1988):** Isolation of flagella from the archaeobacterium *Methanococcus voltae* by phase separation with Triton X-114
J. Bacteriol., **170**, 1752-1758
- Kalmokoff M.L., Koval S.F. und Jarrell K.F. (1992):** Relatedness of the flagellins from methanogens
Arch. Microbiol., **157**, 481-487
- Kanto S., Okino H., Aizawa S.-I. und Yamaguchi S. (1991):** Amino acids responsible for flagellar shape are distributed in terminal regions of flagellin
J. Mol. Biol., **219**, 471-480
- Kaplan C.W., Lux R., Haake S.K. und Shi W. (2009):** The *Fusobacterium nucleatum* outer membrane protein RadD is an arginine-inhibitable adhesion required for inter-species adherence and the structured architecture of multi-species biofilm
Mol. Microbiol., **71**, 35-47
- Keizer D.W., Slupsky C.M., Kalisiak M., et al. (2001):** Structure of a pilin monomer from *Pseudomonas aeruginosa*: implications for the assembly of pili
J. Biol. Chem., **276**, 24186-24193
- Klausen M., Heydorn A., Ragas P., et al. (2003):** Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants
Mol. Microbiol., **48**, 1511-1524

- Kostyukova A.S., Polosina Y.Y., Pyatibratov M.G., et al. (1994):** Archaeal flagella assembly evidently requires chaperone assistance
Dokl. Akad. Nauk., **339**, 544-546
- Koval S.F. und Jarrell K.F. (1987):** Ultrastructure and biochemistry of the cell-wall of *Methanococcus voltae*
J. Bacteriol., **169**, 1298-1306
- Kremer J.M., Mastronarde D.N. und McIntosh J.R. (1996):** Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD
J. Struct. Biol., **116**, 71-76
- Krogh A., Larsson B., von Heijne G. und Sonnhammer E.L.L. (2001):** Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes
J. Mol. Biol., **305**, 567-580
- Küper U., Meyer C., Müller V., et al. (2010):** Energized outer membrane and spatial separation of metabolic processes in the hyperthermophilic Archaeon *Ignicoccus hospitalis*
PNAS, **107**, 3152-3156
- Kupper J., Marwan W., Typke D., et al. (1994):** The flagellar bundle of *Halobacterium salinarum* is inserted into a distinct polar cap structure
J. Bacteriol., **176**, 5184-5187
- Ladenstein R. und Antranikian G. (1998):** Proteins from hyperthermophiles: Stability and enzymatic catalysis close to the boiling point of water
In: Biotechnology of extremophiles
Springer Verlag Berlin, Heidelberg
- Larsen S.H., Reader R.W., Kort E.N., et al. (1974):** Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in *Escherichia coli*
Nature, **249**, 74-77
- Lämmli U.K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature, **227**, 680-685
- Lechner J. und Wieland F. (1989):** Structure and biosynthesis of procaryotic glycoproteins
Annu. Rev. Biochem., **58**, 173-194
- Leeuwenhoeck A. (1684):** An Abstract of a Letter from Mr. Anthony Leewenhoeck at Delft, Dated Sep. 17. 1683. Containing Some Microscopical Observations, about Animals in the Scurf of the Teeth, the Substance Call'd Worms in the Nose, the Cuticula Consisting of Scales
Phil. Trans., **14**, 568-574
- Liu R. und Ochman H. (2007):** Stepwise formation of the bacterial flagellar system
PNAS, **104**, 7116-7121

- Löffler F. (1889):** Eine neue Methode zum Färben der Mikroorganismen im Besonderen ihrer Wimpernhaare und Geisseln
Zentralbl. Bakt. Parasitenk., **6**, 209-224
- Logan S.M. (2006):** Flagellar glycosylation – a new component of the mobility repertoire?
Microbiology, **152**, 1249-1262
- Macnab R.M. (1977):** Bacterial flagella rotating in bundles: a study in helical geometry
PNAS, **74**, 221-225
- Macnab R.M. und Ornston M.K. (1977):** Normal-to-curly flagellar transitions and their role in bacterial tumbling
J. Mol. Biol., **112**, 1-30
- Macnab R.M. (2003):** How bacteria assemble flagella
Annu. Rev. Microbiol., **57**, 77-100
- Macnab R.M. (2004):** Type III flagellar protein export and flagellar assembly
Biochim. Biophys. Acta., **1694**, 207-217
- Mastrorade D.N. (2006):** Tomographic reconstruction with the IMOD software package
Microsc. Microanal., **12**, 178-179
- Mattick J.S. (2002):** Type IV pili and twitching motility
Annu. Rev. Microbiol., **56**, 289-314
- Merz A.J., Enns C.A. und So M. (1999):** Type IV pili of pathogenic *Neisseriae* elicit cortical plaque formation in epithelial cells
Mol. Microbiol., **32**, 1316-1332
- Merz A.J. und Forest K.T. (2002):** Bacterial surface motility: slime trails, grappling hooks and nozzles
Curr. Biol., **12**, 297-303
- Metlina A.L. (2004):** Bacterial and archaeal flagella as prokaryotic motility organelles
Biochem., **69**, 1203-1212
- Meyer C. (2007):** Charakterisierung von Zellanhängen und extrazellulären Strukturen bei *Ignicoccus pacificus*
Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Miller J.H. (1972):** Experiments in molecular genetics
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Mimori-Kiyosue Y., Vonderviszt F. und Namba K. (1997):** Locations of terminal segments of flagellin in the filament structure and their roles in polymorphism and polymerization
J. Mol. Biol., **270**, 222-237
- Moissl C., Rachel R., Briegel A., et al. (2005):** The unique structure of archaeal 'hami', highly complex cell appendages with nono-grappling hooks
Mol. Microbiol., **56**, 361-370

- Moissl C., Rudolph C., Rachel R., et al. (2003):** In situ growth of the novel SM1 euryarchaeon from a string-of-pearls-like microbial community in its cold biotope, its physical separation and insights into its structure and physiology
Arch. Microbiol., **180**, 211-217
- Morand P.C., Bille E., Morelle S., et al. (2004):** Type IV pilus retraction in pathogenic *Neisseria* is regulated by PilC proteins
EMBO J., **23**, 2009-2017
- Morgan D.G., Macnab R.M., Francis N.R., et al. (1993):** Domain organization of the subunit of the *Salmonella* flagellar hook
J. Mol. Biol., **229**, 79-84
- Morgan D.G., Owen C., Melanson L.A. and DeRosier D.J. (1995):** Structure of bacterial flagellar filaments at 11 Å resolution: packing of the alpha-helices
J. Mol. Biol., **249**, 88-110
- Müller D. (2005):** Charakterisierung der Zellanhänge von *Ignicoccus* sp.
Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Müller D., Meyer C., Gürster S., et al. (2009):** The Iho0670 fibers of *Ignicoccus hospitalis*: a new type of archaeal cell surface appendage
J. Bacteriol., **191**, 6465-6468
- Muscholl A., Galli D., Wanner G. und Wirth R. (1993):** Sex pheromone plasmid pAD1- encoded aggregation substance of *Enterococcus faecalis* is positively regulated in trans by traE1
Eur. J. Biochem., **214**, 333-338
- Namba K., Yamashita I. und Vonderviszt F. (1989):** Structure of the core and central channel of bacterial flagella
Nature, **342**, 648-654
- Näther D.J. und Rachel R. (2004):** The outer membrane of the hyperthermophilic archaeon *Ignicoccus*: dynamics, ultrastructure and composition
Biochem. Soc. Trans., **32**, 199-203
- Näther D.J., Rachel R., Wanner G. und Wirth R. (2006):** Flagella of *Pyrococcus furiosus*: Multifunctional organelles, made for swimming, adhesion to various surfaces, and cell-cell contacts
J. Bacteriol., **188**, 6915-6923
- Ng S.Y., Chaban B. und Jarrell K.F. (2006):** Archaeal flagella, bacterial flagella and type IV pili: a comparison of genes and posttranslational modifications
J. Mol. Microbiol. Biotechnol., **11**, 167-191
- Nickell S., Förster F., Linaroudis A. et al. (2005):** TOM software toolbox: acquisition and analysis for electron tomography
J. Struct. Biol., **149**, 227-234

- Nickell S., Hegerl R., Baumeister W. und Rachel R. (2003):** *Pyrodictium* cannulae enter the periplasmic space but do not enter the cytoplasm, as revealed by cryo-electron tomography
J. Struct. Biol., **141**, 34-42
- Nudelman E. und Kaiser D. (2004):** Pulling together with type IV pili
J. Mol. Microbiol. Biotechnol., **7**, 52-62
- Nunn D.N. und Lory S. (1993):** Cleavage, methylation, and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* export proteins XcpT, -U, -V, and -W
J. Bacteriol., **175**, 4375-4382
- O'Brian E.J. und Bennett P.M. (1972):** Structure of straight flagella from a mutant *Salmonella*
J. Mol. Biol., **70**, 133-152
- Oliver T., Schmidt B., Nathan D., et al. (2005):** Using reconfigurable hardware to accelerate multiple sequence alignment with ClustalW
Bioinformatics, **21**, 3431-3432
- Paerregaard A., Espersen F. und Skurnik M. (1991):** Role of the *Yersinia* outer membrane protein YadA in adhesion to rabbit intestinal tissue and rabbit intestinal brush border membrane vesicles
APMIS, **99**, 226-232
- Palm, L.C. (1982):** Antoni van Leeuwenhoek, 1632–1723: Studies on the Life and Work of the Delft Scientist Commemorating the 350th Anniversary of His Birthday
Rodopi B.V., Amsterdam
- Paper W., Jahn U., Hohn M.J., et al. (2007):** *Ignicoccus hospitalis* sp. nov., the host of 'Nanoarchaeum equitans'
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **57**, 803-808
- Parge H.E., Forest K.T., Hickley M.J., et al. (1995):** Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution
Nature, **378**, 32-38
- Patel P., Marrs C.F., Mattick J.S., et al. (1991):** Shared antigenicity and immunogenicity of type IV pilins expressed by *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella bovis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Dichelobacter nodosus*, and *Vibrio cholerae*
Infect. Immun., **59**, 4674-4676
- Peabody C.R., Chung Y.J., Yen M.R., et al. (2003):** Type II secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella
Microbiology, **149**, 3051-3072
- Perkins D.N., Pappin D.J.C., Creasy D.M. und Cottrell J.S. (1999):** Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data
Electrophoresis, **20**, 3551-3567

- Podar M., Anderson I., Makarova K.S., et al. (2008):** A genomic analysis of the archaeal system *Ignicoccus hospitalis*-*Nanoarchaeum equitans*
Genome Biol., **9**, R158
- Polosina Y.Y., Jarrell K.F., Fedorov O.V., et al. (1998):** Nucleoside diphosphate kinase from haloalkaliphilic archaeon *Natronobacterium magadii*
Extremophiles, **2**, 333-338
- Pugsley A.P. und Possot O. (1993):** The general secretory pathway of *Klebsiella oxytoca*: no evidence for relocalization or assembly of pilin-like PulG protein into a multiprotein complex
Mol. Microbiol., **10**, 665-674
- Rachel R., Wyschkony I., Riehl S. und Huber H. (2002):** The ultrastructure of *Ignicoccus*: Evidence for a novel outer membrane and for intracellular vesicle budding in an archaeon
Archaea, **1**, 9-18
- Ramboarina S., Fernandes P.J., Daniell S., et al. (2005):** Structure of the bundle-forming pilus from enteropathogenic *Escherichia coli*
J. Biol. Chem., **48**, 40252-40260
- Reichert K. (1909):** Über die Sichtbarmachung der Geißeln und die Geißelbewegung der Bakterien
Zentralbl. Bakter. I, **51**, 1-83
- Rieger G. (1998):** Elektronenmikroskopische und biochemische Untersuchungen zum Aufbau des Netzwerkes bei *Pyrodictium*
Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät III – Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg
- Rieger G., Rachel R., Hermann R. und Stetter K.O. (1995):** Ultrastructure of the hyperthermophilic archaeon *Pyrodictium abyssi*
J. Struct. Biol., **115**, 78-87
- Rudel T., Facius D., Barten R., et al. (1995):** Role of pili and the phase-variable PilC protein in natural competence for transformation of *Neisseria gonorrhoeae*
PNAS, **92**, 7986-7990
- Rudolph C., Wanner G. und Huber H. (2001):** Natural communities of novel archaea and bacteria growing in cold sulfurous springs with a string-of-pearls-like morphology
Appl. Environ. Microbiol., **67**, 2336-2344
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., et al. (1988):** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase
Science, **239**, 487-491
- Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T. (1989):** Molecular cloning, a laboratory manual
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

- Saxton W.O., Baumeister W. und Hahn M. (1984):** Three-dimensional reconstruction of imperfect two-dimensional crystals
Ultramicroscopy, **13**, 57-70
- Schägger H. und von Jagow G. (1987):** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa
Anal. Biochem., **166**, 223-231
- Schägger H. und von Jagow G. (1991):** Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form
Anal Biochem., **199**, 223-231
- Schägger H., Cramer W.A. und von Jagow G. (1994):** Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis
Anal. Biochem., **217**, 220-230
- Seidler R.J. und Starr M.P. (1968):** Structure of the flagellum of *Bdellovibrio bacteriovorus*
J. Bacteriol., **95**, 1952-1955
- Seiffert D. und Smith J.W. (1997):** The cell adhesion domain in plasma vitronectin is cryptic
J. Biol. Chem., **272**, 13705-13710
- Shi W. und Sun H. (2002):** Type IV pilus-dependent motility and its possible role in bacterial pathogenesis
Infect. Immun., **70**, 1-4
- Sjoblad R.D., Emala C.W. und Doetsch R.N. (2005):** Invited review: Bacterial flagellar sheaths: structures in search of a function
Cell. Mot. Cyto., **3**, 93-103
- Skerker J.M. und Berg H.C. (2001):** Direct observation of extension and retraction of type IV pili
PNAS, **98**, 6901-6904
- Speranskii V.V., Metlina A.L., Novikova T.M. und Bakeyeva L.Y. (1996):** Disk-like lamellar structure as part of the archaeal flagellar apparatus
Biophysics, **41**, 167-173
- Starr M.P. und Baigent (1966):** Parasitic interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* with other bacteria
J. Bacteriol., **91**, 2006-2017
- Sterner R. und Liebl W. (2001):** Thermophilic adaptation of Proteins
Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., **36**, 39-106
- Stetter K.O., König H. und Strackebrand E. (1983):** *Pyrodictium* gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulphur-reducing archaeobacteria growing optimally at 105 °C
Syst. Appl. Microbiol., **4**, 535-551

- Strom M.S., Nunn D. und Lory S. (1991):** Multiple roles of the pilus biogenesis protein pilD: involvement of pilD in excretion of enzymes from *Pseudomonas aeruginosa*
J. Bacteriol., **173**, 1175-1180
- Studer D., Graber W., Al-Amoudi A., et al. (2001):** A new approach for cryofixation by high-pressure freezing
J. Microsc., **203**, 285-294
- Sumper M. (1987):** Halobacterial glycoprotein biosynthesis
Biochim. Biophys. Acta, **906**, 69-79
- Sun H., Zusman D.R. und Shi W. (2000):** Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the *frz* chemosensory system
Curr. Biol., **10**, 1143-1146
- Szabó Z., Stahl A.O., Albers S.-V., et al. (2007):** Identification of diverse archaeal proteins with class III signal peptides cleaved by distinct archaeal prepilin peptidases
J. Bacteriol., **189**, 772-778
- Tanaka K., Waki H., Ido Y., et al. (1988):** Protein and polymer analyses up to m/z 10,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry
Rapid. Commun. Mass Spectrom., **2**, 151-153
- Thoma C., Frank M., Rachel R., et al. (2008):** The Mth60 fimbriae of *Methanothermobacter thermoautotrophicus* are functional adhesins
Environ. Microbiol., **10**, 2785-2795
- Thomas N.A., Bardy S.L. und Jarrell K.F. (2001):** The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure
FEMS Microbiol. Rev., **25**, 147-174
- Thomas N.A. und Jarrell K.F. (2001):** Characterization of flagellum gene families of methanogenic archaea and localization of novel flagellum accessory proteins
J. Bacteriol., **183**, 7154-7164
- Thomas N.A., Mueller S., Klein A. und Jarrell K.F. (2002):** Mutants in *flaI* and *flaJ* of the archaeon *Methanococcus voltae* are deficient in flagellum assembly
Mol. Microbiol., **46**, 879-887
- Thomashow L.S. und Ritterberg S.C. (1985):** Isolation and composition of sheathed flagella from *Bdellovibrio bacteriovorus*
J. Bacteriol., **163**, 1047-1054
- Trachtenberg S. und DeRosier (1992):** A three-start helical sheath on the flagellar filament of *Caulobacter crescentus*
J. Bacteriol., **174**, 6198-6206

Trachtenberg S., Galkin V.E. und Egelman E.H. (2005): Refining the structure of the *Halobacterium salinarum* flagellar filament using the iterative helical real space reconstruction method: insights into polymorphism

J. Mol. Biol., **346**, 665-676

Turner L., Ryu W.S. und Berg H.C. (2000): Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments

J. Bacteriol., **182**, 2793-2801

VanDyke D.J., Wu J., Ng S.Y., et al. (2008): Identification of putative acetyltransferase gene, MMP0350, which affects proper assembly of both flagella and pili in the archaeon *Methanococcus maripaludis*

J. Bacteriol., **190**, 5300-5307

Vanhecke D., Graber W. und Studer D. (2008): Close-to-native ultrastructural preservation by high pressure freezing

Methods Cell Biol., **88**, 151-164

van Schaik E.J., Giltner C.L., Audette G.F., et al. (2005): DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* Type IV pili

J. Bacteriol., **187**, 1455-1464

Voisin S., Houlston R.S., Kelly J., et al. (2005): Identification and Characterization of the unique N-linked glykan common to the flagellins and S-Layer glycoprotein of *Methanococcus voltae*

J. Biol. Chem., **280**, 16586-16593

Wang K. und Lu C. (2007): Adhesion activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a chinese *streptococcus suis* type 2 strain

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr., **120**, 207-209

Wang Y.A., Yu X., Overman S., et al. (2006): The structure of a filamentous bacteriophage

J. Mol. Biol., **361**, 209-215

Warming E. (1875): Om nogle veg Danmarks Kyster levende Bakterier

Medd. naturhist. For. Kjöbenhavn, **7**, 356-376

Wasserburger N. (2008): Anzucht, elektronenmikroskopische Präparation und Darstellung der archaeellen Cokultur von *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*

Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg

Waters E., Hohn M.J., Ahel I., et al. (2003): The genome of *Nanoarchaeum equitans*: Insights into early archaeal evolution and derived parasitism

PNAS, **100**, 12984-12988

Watts T.H., Worobec E.A. und Paranchych W. (1982): Identification of pilin pools in the membranes of *Pseudomonas aeruginosa*

J. Bacteriol., **152**, 687-691

- Whittaker R.H. (1969):** New concepts of kingdoms of organisms
Science, **163**, 150–160
- Woese C.R., Kandler O. und Wheelis M.L. (1990):** Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya
PNAS, **87**, 4576-4579
- Wu S.S. und Kaiser D. (1997):** The *Myxococcus xanthus pilT* locus is required for social gliding motility although pili are still produced
Mol. Microbiol., **23**, 109-121
- Xu X.F., Tan Y.W., Larn L., et al. (2004):** NMR structure of a type IVb pilin from *Salmonella typhi* and its assembly into pilus
J. Biol. Chem., **279**, 31599-31605
- Yamashita I., Hasegawa K., Suzuki H., et al. (1998):** Structure and switching of bacterial flagellar filament studied by X-ray fiber diffraction
Nat. Struct. Biol., **5**, 125-132
- Yonekura K., Maki S., Morgan D.G., et al. (2000):** The bacterial flagellar cap as a rotary promoter of flagellin self-assembly
Science, **290**, 2148-2152
- Yonekura K., Maki-Yonekura S. und Namba K. (2003):** Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy
Nature, **424**, 643-650
- Yonekura K., Maki-Yonekura S. und Namba K. (2005):** Building the atomic model for the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy and image analysis
Structure, **13**, 407-412
- Yonekura S.M., Yonekura K. und Namba K. (2010):** Conformational change of flagellin for polymorphic supercoiling of the flagellar filament
Nat. Struct. Mol. Biol., **17**, 417-423
- Yu X., Angov E., Camerini-Otero R.D. und Egelman E.H. (1995):** Structural Polymorphism of the RecA protein from the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus*
Biophys. J., **69**, 2728-2738
- Yu N.Y., Wagner J.R., Laird M.R., et al. (2010):** PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes
Bioinformatics, btq249v1-btq249
- Zettnow E. (1899):** Romanowski's Farbung bei Bakterien
Z. Hyg. Infektionskrankh., **30**, 1-18

Zhang P., Chomel B.B., Schau M.K., et al. (2004): A family of variably expressed outer-membrane proteins (Vomp) mediates adhesion and autoaggregation in *Bartonella quintana*
PNAS, **101**, 13630-13635

Zolghadr B., Klingl A., Koerdt A., et al. (2010): Appendage-mediated surface adherence of *Sulfolobus solfataricus*
J. Bacteriol., **192**, 104-110

VIII Publikationen

- Burghardt T., Saller M., Gürster S., Müller D., Meyer C., Jahn U., Hochmuth E., Deutzmann R., Babinger P., Wirth R., Huber H. und Rachel R. (2008). Insight into the proteome of the hyperthermophilic Crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis*: the major cytosolic and membrane proteins. *Archives of Microbiology*, 190, 379-394.
- Müller D.W., Meyer C., Gürster S., Küper U., Huber H., Rachel R., Wanner G., Wirth R. und Bellack A. (2009). The Iho670 fibers of *Ignicoccus hospitalis*: a new type of archaeal cell surface appendage. *Journal of Bacteriology*, 191, 6465-6468.
- Winkelmann N., Jaekel U., Meyer C., Serrano W., Rachel R., Rosselló-Mora R. und Harder J. (2010). Determination of the diversity of *Rhodopirellula* isolates from European seas by multilocus sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 776-785.
- Küper U., Meyer C., Müller V., Rachel R. und Huber H. (2010). Energized outer membrane and spatial separation of metabolic processes in the hyperthermophilic Archaeon *Ignicoccus hospitalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 3152-3156.
- Rachel R., Meyer C., Klingl A., Gürster S., Wasserburger N., Küper U., Bellack A., Wirth R., Huber H. und Wanner G. (2010). Analysis of the Ultrastructure of Archaea by Electron Microscopy. In: *Methods in Cell Biology*, 96, 45-66.

Zum Schluss möchte ich Allen danken, die durch ihre tatkräftige Hilfe zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben! Mein besonderer Dank gilt:

...meinem Doktorvater **PD Dr. Reinhard Rachel**, der mir die Möglichkeit gegeben hat dieses spannende Thema zu bearbeiten. Danke für die hilfreichen Diskussionen, das Vertrauen in meine Arbeit, die stetige Begeisterungsfähigkeit und seine Hilfe in allen technischen Belangen!

...**Prof. Dr. Reinhard Wirth**, für das Interesse am Fortgang meiner Arbeit, für die Unterstützung und die hilfreichen Anregungen und Diskussionen, die immer eine große Hilfe waren!

...**Prof. Dr. Ralph Witzgall** und **Prof. Dr. Michael Thomm**, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in ihren Instituten durchführen zu können und die freundliche Aufnahme in ihre Lehrstühle!

...**Dr. Harald Huber** für die nützlichen Tipps und Anreize innerhalb des *Igni-Nano*-Seminars.

...**Prof. Dr. Rainer Deutzmann** und **Eduard Hochmuth** für ihre Hilfe bei verschiedenen Sequenzierungen und die Auswertung der Daten.

...**Dr. Jörg Reinders** für die Hilfe in Bezug auf zahlreiche Fragen bezüglich der Immunpräzipitation und die Analyse der Ergebnisse!

...**Dr. Karin Babinger** für ihre geduldige Unterstützung in allen Fragen der Klonierung sowie **Dr. Patrick Babinger** für die Theorie hinter den Klonierungsexperimenten. Ohne ihre Hilfe hätte Vieles länger gedauert!

...**Prof. Dr. Eduard Egelman** für sein Interesse an dem Projekt, seine schnelle und unkomplizierte Hilfe und die phantastische Zusammenarbeit bei der Rekonstruktion des Fiber-Filaments!

...**Dr. Anne-Sarah Raschta** und **Sonja Gürster** für ihre Freundschaft, die aufbauenden und oft auch tröstenden Worte und vor allem für die lustigen Stunden und Gespräche. Sie haben wesentlich zu der guten Atmosphäre beigetragen und meine Arbeit wesentlich erleichtert!

...**Tillmann Burghardt, Andreas Klingl, Thomas Heimerl, Jürgen Kastner, Astrid Neumann, Jenny Flechsler** und **Benjamin Salecker** sowie sämtlichen Diplomanden und Praktikanten für das gute Arbeitsklima und ihre Hilfe beim Gelingen dieser Arbeit! Es muss sich nicht immer um wissenschaftliche Diskussionen handeln, um eine Aufgabe voran zu treiben!

...**Benkamin Salecker, Thomas Heimerl** und **Christian Meyer** für ihre geduldige Hilfe am PC!

...allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Anatomie und Mikrobiologie.

...meinen Freunden in der Heimat, die mir immer ein Rückhalt sind und waren! Danke, dass ich auch in schwierigen Situationen immer auf euch zählen konnte!

...**Michael Meier**, der im Verlauf dieser Arbeit wohl am meisten aushalten musste! Danke für deine seelische Unterstützung und die Aufmunterung und Ablenkung in oft schwierigen Situationen!

Der größte Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern **Johann** und **Renate Meyer**, die immer für mich da waren und sind! Ohne Euch hätte ich Vieles nicht durchgestanden! Danke auch an meine Oma **Sonja Fischermeier**, deren Begeisterung mich immer wieder angetrieben hat!

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benützt habe.

Regensburg, September 2010

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Carolin Maria Meyer
geboren am: 30.03.1983 in Eichstätt
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1989 - 1993 Grund- und Teilhauptschule Eitensheim

1993 - 2002 Katharinen-Gymnasium Ingolstadt
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

Universität Regensburg

2002 - 2007 Studium der Biologie und Diplomarbeit mit dem Thema „Charakterisierung von Zellanhängen und extrazellulären Strukturen bei *Ignicoccus pacificus*“ unter der Betreuung von PD Dr. Reinhard Rachel, Lehrstuhl für Mikrobiologie und Zentrum für Elektronenmikroskopie

Promotion

Universität Regensburg

Seit Juli 2007 Promotion mit dem Thema „Untersuchung der Fibers von *Ignicoccus hospitalis*“ unter der Betreuung von PD Dr. Reinhard Rachel, Lehrstuhl für Mikrobiologie und Zentrum für Elektronenmikroskopie

